SÉRIE A, N° 4463
N° D'ORDRE 5311

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Madame ISCAKI née POTTIER

1re THÈSE. — « Étude sur l'oxydation de l'éthanol par la levure de boulangerie *(Saccharomyces cerevisiae)* ».

2e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.
« La fixation du gaz carbonique par les tissus ».

Soutenues le *mai 1965 devant la Commission d'examen*

26 MAI 1965

M. MONNIER, *Président.*

Mlle LE BRETON
Mlle VEIL
Examinateurs.

Série A, n° 4463
N° d'ordre 5311

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Madame ISCAKI née POTTIER

1re THÈSE. — « Étude sur l'oxydation de l'éthanol par la levure de boulangerie *(Saccharomyces cerevisiae)* ».

2e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.
« La fixation du gaz carbonique par les tissus ».

Soutenues le mai 1965 devant la Commission d'examen

M. MONNIER, *Président.*

Mlle LE BRETON
Mlle VEIL
} *Examinateurs.*

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen..... M. ZAMANSKY

BRELOT	T	Analyse supérieure.
PRENANT	T	Anatomie et histologie comparée.
GRASSE	T	Évolution des êtres organisés.
PREVOST	T	Chimie organique.
WYART	T	Minéralo et cristallo.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végé (Orsay).
AUGER	T	Physique quantique et relativité.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
N...	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du globe.
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (S.P.C.N.).
CHRETIEN	T	Chimie minérale.
BOCQUET	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique (E.N.S.).
EPHRUSSI	T	Génétique.
RIVIERE	T	Géologie (S.P.C.N. et sédiment (Orsay).
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.).
LUCAS R.	T	Recherches physiques.
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Physique enseignement.
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.).
FORTIER	T	Mécanique exp. des fluides.
DRACH	T	Zoologie.
QUENEY	T	Météo et dynamique atmos.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC	T	Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du globe.
L'HERITIER	T	Biologie générale Orsay.
GRIVET	T	Radioélectricité Orsay.
PONCIN	T	Mécanique générale.
DU BREIL	T	Arith. et théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Géologie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffracélec.
WIEMANN	T	Chimie organ. et structu.
JACQUINOT	T	Spectrocospie et physique céleste (Orsay).
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T	Théorie physique.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minérall et cristal.
J.-P. MATHIEU	T	Physique optique.
COUTEAUX	T	Cytologie.
MAY	T	Zoologie.
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et topologie.
FELDMANN	T	Biologie végétale marine.
GUINIER	T	Physique des solides (Orsay).
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des probabilité et physique mathématiques.
SCHWARTZ	T	Calcul dif. et intégral.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation (technique aéron.).
NORMANT	T	Synthèse organique.
BENARD	T	Chimie minérale.
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
DUGUE	T	Statistique mathématiques.
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie végé. appli.
MARÉCHAL	T	Optique théo et appli.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
Mlle LE BRETON	T	Physio de la nutrition.
LELONG	T	Appli de l'ana à la géom.
DEVILLERS	T	Anatomie et histo compa.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANCON	T	Physique (S.P.C.N.).
GLANGEAUD	T	Géographie physique et géol.
DODEMENT	T	Mathématiques (M.G.P.).
PISOT	T	Technique math. de la physique.
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMANN	T	Astrophysiqye.
TERMIER	T	Géologie générale.
ZAMANSKY	T	Mathémathiques générale.
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.).
RIZET	T	Génétique Orsay.
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.)
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN	T	Électrotechnique géné.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
Mme CHAIX	T	Chimie biologique,.
Mme HUREL PY	T	Biologie végétale (P.C.B.).
PANNETIER	T	Chimie générale.
BRUN	T	Mécanique des fluides I.
LEDERER	T	Chimie biologique (Orsay).
Mme DUBREIL	T	Mathématiques (agréga.).
Mme LELONG	T	Math. II (E.N.S.).
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
COTTE	T	Physique électricité.
DUBOIS J. E.	T	Chimie Organique.
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
MICHEL A.	T	Chimie minérale Orsay.
OLMER	T	Énergétique générale.
ROUAULT	T	Électricité (Orsay).
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER	T	Physiologie comparée.
CAMUS	T	Physio végé.
CASTAING	T	Physique II thermo (Orsay).
CURIEN	T	Minéralo et cristal.
MOYSE	T	Physio végé (Orsay).
Mme CHAR - NIAUX-COTTON	T	Évolution des êtres organisés.
POSSOMPES	T	Zoologie.
PULLMANN	T	Chimie quantique.
TEILLAC	T	Physique nuc. et radioactivité (Orsay).
TONNELAT	T	Bio-physico chim. (Orsay).
VILLE	T	Économétrie.
WILLEMART	T	Chimie (P.C.B.).
DODE	T	Chimie (Orsay).
FREYMANN	T	Recherches physiques.
GUINOCHET	T	biolo. végé (S.P.N.C.) (Orsay).
ROLLET	T	Chimie minérale.
Mlle JOSIEN	T	Chimie (S.P.C.N.).
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
ARNOULT	T	Électronique (Orsay).
CHAPELLE	T	Physique I (Orsay).
DELANGE	T	Mathématiques I (Orsay).
DENY	T	Mathé. gén. (Orsay).
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.
LUCAS	T	Géologie.
ALLARD	T	Chimie physique.
BERTHELOT	T	Physique des particules fondamentales (Orsay).
BRICARD	T	Météor et physique de l'atmos.
Mme ALBE FESSARD	T	Psycho. physio.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

FRIEDEL	T	Physique des solides (Orsay).
M. JULIA	T	Études des moléculaires complexes.
LENDER	T	Biologie animale (S.P.C.N.) Orsay.
MAGAT	T	Physico chimie des radio-éléments.
Mlle QUINTIN	T	Électrochimie.
MONOD	T	Chimie du métabolisme.
BENOIT	T	Physio animale Orsay.
DE POSSEL	T	Analyse numérique.
CHARLOT	T	Chimie analytique.
LEMÉE	T	Écologie végétale Orsay.
GUÉRIN	T	Chimie (M.P.C.) Orsay.
CHATELET	T	Chimie (P.C.B.).
JEAN	T	Physio nucléaire Orsay.
MATTLER	T	Physique (S.P.C.N.).
BERGERARD	T	Zoologie Orsay.
BERTEIN	T	Électronique Orsay.
BOUISSIÈRES	T	Radiochimie.
Mme COUTURE	T	Thermo. et méca. physique.
ELLEMBERGER	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay).
FRANC	T	Biologie animale (P.C.B.).
SCHNELL	T	Botanique tropicale.
STLKOWSKI	T	Physiologie végétale.
ACHER	T	Chimie biologique.
BAUDOIN	T	Biologie animale (P.C.B.).
BEAUMONT	T	Biologie animale (S.P.C.N.).
BLAMONT	T	Géophysique ionosphère.
BOUREAU	T	Botanique.
CURIE D.	T	Physique (M.G.P.
DURAND DEL-GA	T	Géologie.
FRÉON	T	Chimie organique Orsay.
HELLER	T	Physiologie végétale.
TORTRAT	T	Calcul des probabilités.
CAILLEUX	T	Géologie (S.P.C.N.).
MAGNAN	T	Physique électricité.
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appl. à la chimie théo et à la physique nucléaire.
Mlle FOURCROY		Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mme CHOQUET-BRUHAT		Mécanique analytique et méca céleste.
Mlle VEIL	T	Physiologie générale.
LWOFF	T	Microbiologie.
SIESTRUNCK	T	Méca phys. et expérimentale.
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).
BROCHARD	T	Physique (P.C.B.) (Orsay).
CABANNES	T	Mécanique générale.
LESIEUR	T	Mathl (Orsay).
MAZET	T	Mécanique générale (Orsay).
CAIRE		Géogr. physique et géog. dynamique
COMOLET		Mécanique des fluides.
CORABOEUF	T	Physique animale (Orsay).
DELLOUE	T	Physique de l'exosphère.
GORENFLOT		Botanique II (Orsay).
HOUILLON		Biologie animale (P.C.B.).
JULLIEN J.		Chimie (S.P.C.N.). (Orsay).
MALGRANGE	T	Technique math. de la phys. (Orsay).
OLIVIER		Anthropologie.
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay).
BLANC - LAPIERRE	T	Physique (E.N.S.) (Orsay).
CHEVAUGEON	T	Botanique (Orsay).
KAHANE	T	Mathématiques (Orsay).
SAMUEL	T	Math. (E.N.S.) féminines.
KOURGANOFF	T	Astronomie (Orsay).
THIRY	T	Mécanique céleste.
ABELES		Physique (S.P.C.N.)
AMAT	T	Physique (P.C.B.).
AUBOIN	T	Géologie.
Mme BENOIT-GUEUTAL	T	Physique nucléaire et radio-activité (Orsay).
BOUGIS		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer.)
BRUHAT	T	Mathématiques (M.P.C.).
BRUNN	T	Géologie historique (Orsay).
CHABBAL	T	Physique (M.G.P.) (Orsay).
DEHEUVELS	T	Mathématiques propé.
D'ESPAGNAT	T	Physique théorique (Orsay).
FURON	T	Géologie (S.P.C.N.).
Mme GANS	T	Génétique,
GENEVES		Biologie végétale (P.C.B.).
GUILBERT		Physique C.U.S. (Orléans).
HUPE	T	Pétrographie.
HOLLANDE	T	Biologie générale.
LIONS	T	Analyse numérique,
MAITTE	T	Chimie (P.C.B.).
MEYER		Physique prop.
NICOLAS		Géologie appliquée.
PANIGEL		Biologie générale.
RAVIER		Pétrographie
ROSEAU	T	Mécan. théorique des fluides.
ROUBINE		Électronique.
SILBER	T	Chimie (P.C.B.).
UEBERSFELD	T	Électronique.
YVON	T	Théories physiques.
HERVÉ	T	Mathématiques.
NÉRON	T	Mathématiques (M.P.C.) (Orsay).
Mme PECKER - WIMEL	T	Astrophysique.
BALKANSKY		Physique (M.P.C.).
LE CORRE	T	Électricité.
DELCROIX	T	Physique théorique (Orsay).
GOURDIN		Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
LEHMANN	T	Phys. exp. des hautes énergies.
NATAF	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
ÉCHALIER		Biologie animale (P.C.B.).
BARRAUD		Physiologie cellulaire.
LIORET		Physiologie végétale (Orsay).
DARS		Géologie structurale et géologie appliquée.
CAMEFORT	T	Botanique (agrégation).
VICHNIEWSKY	T	Mécanique industrielle.
BLAQUIÈRE		Électronique (Orsay).
ARNOUS	T	Physique théorique.
TATIBOUET		Chimie (C.S.U., Orléans).
MALLUVIN	T	Mathématiques prop. (Orsay).
GAUDEMAR		Chimie propédeutique.
PEREZ Y JORBA		Physique Exp. des Hautes énergies (Orsay(.
DAVID	T	Chimie (agrégation Orsay).
BROUSSE	T	Mécanique théorique.
ROSCH	T	Astronomie.
GUY	T	Physique expérimentale.
LAZARD		Mathématiques (M.P.C.).
MOREL Pierre		Physique (M.P.C.).
ARSAC		Programmation.
LEFEBVRE		Chimie (M.P.C.)
CHAPEVILLE		Biochimie.
BENOIT		Physique (C.P.E.M.).
RIO		Chimie (C.P.E.M.).
JAUZEIN		Géologie (E.N.S.).
PRÉVOST G.		B.V. (C.P.E.M.).
FAVARD P.		B.A. (C.P.E.M.).
VILKAS		Chimie (C.P.E.M.).
Mlle FICINI		Chimie (C.P.E.M.).
LEQUEUX		Astronomie.
COHEN - TANNOUDJI		Physique (M.P.C.).
TAVERNIER		Physique (O.P.E.M.).
Mme ROIZEN		Physique (C.P.E.M.).
DURAND M.		B.A. (S.P.C.N.).
PASCAUD		Physiologie.
Mme PETIT		B.A. (C.P.E.M.).
BROUSSE		Géologie (Orsay).
CAGNIAC		Physique agrégation (Orsay).
LEBERRE		Zoologie (Orsay).
SCHEFFER		Microbiologie (Orsay).
DE GENNES		Physique des solides (Orsay).
RIOU		Physique nucléaire exp. (Orsay).
CLAUSER		Chimie biologique (Orsay).
CHEVALIER		Physiologie animale (Orsay).
JANCOVICI		Physique atomique (Orsay).
FALK-VAIRANT		Physique nucléaire (Orsay).
FETIZON		Chimie propédeutique (Orsay).
CERF		Mathématiques (Orsay).

Le Secrétaire Général..... R. FOULLAIN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546825_0060

AVANT-PROPOS

Monsieur le Professeur MONNIER a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et me donner toutes facilités pour mener à bien mon travail, je l'en remercie vivement et lui suis reconnaissante d'avoir accepté la présidence de mon jury de thèse.

J'exprime tout particulièrement ma gratitude et mon attachement à Monsieur DONTCHEFF qui m'a proposé le sujet de mes recherches et m'a guidée avec une sollicitude constante dans l'élaboration de mon travail depuis mon entrée au laboratoire.

Mademoiselle le Professeur LE BRETON a bien voulu s'intéresser à cette étude et me prodiguer ses conseils éclairés, qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mes remerciements sincères.

Mademoiselle le Professeur VEIL m'a toujours réservé un accueil bienveillant et m'a apporté une aide précieuse, je lui exprime ma profonde reconnaissance.

Il m'est agréable de pouvoir témoigner mon infinie gratitude à Monsieur le Professeur TERROINE, mon parrain au Centre National de la Recherce Scientifique, qui m'a toujours accordé son bienveillant appui et m'a constamment assistée de ses précieux conseils. Qu'il soit assuré de mon respectueux attachement.

Mes camarades de laboratoire ont contribué par leur gentillesse à l'agréable atmosphère de travail dans laquelle j'ai effectué ces recherches, j'y suis restée très sensible.

Je n'oublie pas l'aide amicale et dévouée de Messieurs PORTET, ALOUF et MANGALO que je remercie sincèrement.

INTRODUCTION

Les modalités de l'oxydation de l'éthanol chez les êtres vivants ont été bien étudiées sur le plan physiologique.

Les travaux de Le Breton (1936) ont permis de situer dans le cadre des oxydations qui constituent le métabolisme d'un animal, la place que peut prendre l'énergie produite par le catabolisme de l'alcool :

« L'énergie fournie par l'oxydation de l'éthanol n'est utilisable ni pour le travail musculaire, ni pour la thermogénèse de réchauffement, mais sert uniquement à la respiration élémentaire des cellules. »

L'alcool est brûlé sans provoquer d'augmentation du métabolisme basal. Il faut alors considérer qu'il se substitue plus ou moins partiellement aux aliments dont la combustion assure normalement le niveau de la respiration cellulaire.

Dontcheff (1937) (1939) (1953), a étudié les variations et les limites de cette substitution en fonction des conditions nutritives et des facteurs hormonaux auxquels est soumis l'animal. La quantité d'alcool oxydé par kilogramme de poids vif et par heure a reçu le nom de coefficient d'éthyloxydation (C.E.O.). Cet auteur a mis en évidence que le régime alimentaire conditionne le C.E.O. de l'éthanol. La valeur de ce C.E.O. traduit la nature des métabolites oxydés. C'est en régime glucidique que ce coefficient est le plus élevé, il est plus bas en régime protidique et s'abaisse encore au cours de l'évolution du jeûne où les aliments oxydés sont lipidiques.

Dans le cas particulier des glucides, une étude statistique réalisée sur deux espèces animales différentes : Rat et Grenouille et sur une moisissure : le Sterigmatocystis nigra, a permis de chiffrer la grandeur de la substitution de l'alcool : L'oxygène consommé pour la combustion de l'éthanol complètement dégradé par ces organismes représente la moitié des dépenses basales totales.

D'après les résultats de Dontcheff, l'énergie de la combustion de l'alcool se substitue à 50 p. cent de l'énergie fournie par le glucose quand celui-ci assure le métabolisme basal. Ce phénomène retrouvé chez trois catégories d'êtres vivants peut être proposé comme une propriété physiologique de la cellule au niveau de la respiration.

Le travail qui nous a été confié dans le même ordre d'idée est l'étude des modalités de l'utilisation de l'éthanol en présence de glucose chez

la levure de boulangerie. En tant qu'organisme monocellulaire, celle-ci permet l'étude de la respiration cellulaire proprement dite. Les phénomènes métaboliques dus à l'organisation morphologique ou à l'influence de facteurs hormonaux ne peuvent venir interférer chez cet organisme, comme le cas peut se produire chez les êtres pluricellulaires organisés. De plus, la levure possède une propriété supplémentaire, celle de fermenter le glucose et de produire de l'alcool. En dépit de cette particularité, retrouverons-nous chez Saccharomyces cerevisiae, la possibilité de substitution de l'énergie de combustion de l'éthanol à celle du glucose?

Le glucose joue un rôle prépondérant dans la vie de la cellule de levure. Celle-ci prolifère, respire, fermente en utilisant comme principale source énergétique le glucose. Ce sont des polymères du glucose : tréhalose et glycogène qui constituent ses réserves. Enfin dans sa constitution, les glucides représentent le tiers de son poids sec total. Aussi depuis de nombreuses années, la levure a été un des matériaux biologiques de choix pour l'étude du métabolisme des glucides. Il est hors de question de citer ici tous les travaux relatifs à ce sujet. Nous nous bornerons à rappeler que la présence ou l'absence d'oxygène conditionnent en premier lieu le mode de catabolisme du glucose.

1° En anaérobiose il s'agit de fermentation. L'équation de Gay-Lussac traduit le bilan global :

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2,\ \Delta F = -50\ \text{kg cal.}$$

La dégradation s'effectue en 12 étapes qui aboutissent à la formation d'alcool suivant la voie appelée Embden-Meyerhof-Parnas ou voie « E.M.P. ».

2° En aérobiose on parle de respiration. La réaction globale est reproduite par l'équation :

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O \quad \Delta F = -680\ \text{kg cal.}$$

Il faut noter que ce processus fournit beaucoup plus d'énergie à la cellule que le catabolisme anaérobie. La dégradation peut s'effectuer par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas jusqu'à la formation d'acide pyruvique, lequel est oxydé par les réactions du cycle tricarboxylique. Une autre voie de dégradation est celle de Warburg-Dickens-Horecker ou voie de l'hexose monophosphate « H.M.P. ». La prédo-

minance de l'une ou l'autre de ces deux voies peut varier suivant les souches, en réponse à des conditions de culture et de milieu.

Pasteur a été le premier à découvrir le rôle joué par l'oxygène sur le catabolisme du glucose par la levure. Il observa que la présence d'oxygène entraîne une inhibition de la fermentation simultanément à une augmentation de la respiration, tandis que dans le même temps moins de sucre se trouve utilisé. Ce phénomène a reçu le nom d' « Effet Pasteur » et a été défini ainsi « diminution en présence d'air ou d'oxygène du taux de la glycolyse anaérobie ». Il faut mettre en évidence qu'il s'agit d'une inhibition et non d'une suppression complète du phénomène.

En 1951, J. P. Aubert a fait une revue de la question. Cet auteur dégage de l'ensemble des travaux effectués depuis Pasteur à ce sujet, ceux qui permettent d'expliquer les rapports existant entre les systèmes respiratoires et fermentaires et ceux qui précisent l'action de l'oxygène. Retenons parmi les différentes explications proposées la théorie d'Engelhardt (1943) : « L'Effet Pasteur résulterait d'une inhibition d'une réaction de phosphorylation au profit d'une réaction d'oxydation. Le point d'application de l'action de l'oxygène se situe avant la formation de l'hexose diphosphate : Une première étape de phosphorylation commune conduit au glucose-6-phosphate. Cet hexose monophosphate, dans la fermentation, est à nouveau phosphorylé : glucose monophosphate + ATP → fructose diphosphate etc... Dans la respiration, cette réaction est remplacée par une oxydation : glucose monophosphate + NADP → ac. phosphogluconique etc... ». Les travaux d'Aisenberg et coll. (1957) sont en accord avec cette hypothèse.

Il se peut toutefois, qu'il n'y ait pas qu'un seul agent responsable de l'Effet Pasteur et que plusieurs facteurs interviennent simultanément pour produire les phénomènes observés, Nord et Weiss (1958). L'utilisation de substrats radioactifs permet de savoir comment se répartit, entre la voie E.M.P. et la voie H.M.P., le catabolisme du glucose chez la levure. D'après Blumenthal et coll. (1954), en aérobiose, la voie E.M.P. prédomine sur le cycle H.M.P. Katz et Wood (1960) discutent et critiquent les résultats obtenus. Cette question n'est pas complètement résolue chez la levure. Bien des facteurs risquent de rentrer en jeu, parmi lesquels : souche étudiée, mode de culture, conditions expérimentales etc...

En ce qui concerne l'éthanol, la levure ne catabolise pas ce substrat en anaérobiose, ce n'est qu'en présence d'oxygène qu'il peut être dégradé.

L'enzyme responsable de la première étape de l'oxydation de l'alcool : l'alcool deshydrogénase « A.D.H. » est parfaitement connu. Les premières expériences réalisées par Müller avec des préparations solubles d'A.D.H. provenant de la levure datent de 1933. A cette époque Lehman indique que le D.P.N. intervient comme coenzyme. Von Euler et ses collaborateurs (1936), décrivent la réaction d'équilibre de l'oxydation enzymatique de l'alcool.

L'A.D.H. a d'abord été cristallisée à partir de la levure de bière par Negelein et Wulff (1937). Elle est maintenant préparée à partir de la levure de boulangerie, selon les techniques mises au point par Racker (1950) et Keleti (1958).

D'après Hayes et Velick (1954), Van Eys et ses collaborateurs (1957), Wallenfels et coll. (1957), Vallée (1960), Hoch et Vallée (1959 et 1960), c'est un métalloenzyme de poids moléculaire : 150.000, qui comporte 4 à 5 atomes de zinc par molécule et une quarantaine de liaisons SH.

Les propriétés et le mode de fonctionnement de cet enzyme ont été largement étudiés par de nombreux auteurs parmi lesquels : Pullman et coll. (1952), Racker (1955), Nygaard et Theorell (1955), Wallenfels et Sund, ainsi que Malher et Douglas (1957), Van Eys et coll. (1957 et 1958), Westheimer (1959) et Schiner et coll. (1960).

Sund et Theorell (1963) ont fait le point sur l'ensemble des connaissances acquises au sujet des diverses alcooldeshydrogénases de plusieurs espèces animales et végétales, en particulier sur celles du cheval (foie) et de la levure de boulangerie. Résultant des études sur le mécanisme du transfert de l'hydrogène de l'alcool au N.A.D., le schéma proposé est :

$$CH_3CH_2OH + NAD \xrightarrow{ADH} NADH_2 + CH_3CHO$$

$$CH_3CHO + NAD + HS.COA \xrightarrow{ADH} NADH_2 + CH_3COS\text{-}COA$$

L'acétyl coenzyme A formé peut être oxydé dans le cycle de l'acide citrique. Kornberg (1959) a fait une excellente mise au point de cette question. Résumant ses travaux et ceux d'autres auteurs, il apporte des preuves de la réalité de l'oxydation de l'acétate chez la levure de boulangerie selon le schéma proposé par Krebs, ainsi que par la voie dérivée du cycle du glyoxylate. Enfin, il ne faut pas oublier que les réactions de dégradation du glucose et de l'éthanol sont réversibles. Suivant les besoins de la cellule, les systèmes peuvent fonctionner dans le sens catabolique ou anabolique (1).

(1) Nous n'ignorons pas que l'éthanol peut être oxydé par des systèmes peroxydasiques selon Keilin et Hartree, mais c'est principalement chez les animaux et l'homme alcoolique que ces systèmes ont pu être mis en évidence.

Nous venons de voir l'importance de l'oxygène qui conditionne l'utilisation du glucose et de l'éthanol chez la levure. Avec une bonne aération, la levure peut présenter trois formes de métabolisme suivant la composition de son milieu extérieur

— *métabolisme endogène :* en absence totale de substrats, la levure présente de faibles échanges qui résultent du catabolisme de ses réserves,

— *métabolisme exogène :* provoqué par l'utilisation des substrats carbonés introduits dans le milieu de suspension et qui se traduit par des échanges gazeux intenses,

— *prolifération cellulaire :* en présence de substances azotées, de facteurs de croissance et de substrats carbonés, une intense respiration s'accompagne d'une augmentation de la masse cellulaire.

Nous tenons compte de ces différentes considérations pour nous placer dans les conditions qui nous permettent de limiter le plus possible à la seule respiration, le métabolisme du glucose et de l'éthanol.

C'est-à-dire qu'il est essentiel pour nous, d'étudier la levure dans une atmosphère où l'oxygène est présent pour limiter la fermentation. D'autre part, il nous faut utiliser un milieu de suspension dépourvu d'azote et de facteurs de croissance pour éviter la prolifération cellulaire.

Respectant ces conditions expérimentales indispensables, nous exposerons comment il est possible de réduire au maximum la fermentation du glucose.

Dans ces conditions précises nous étudions parallèlement le métabolisme du glucose seul, de l'éthanol seul et du mélange alcool-glucose.

Les critères principaux qui vont nous permettre de déterminer les rapports existant entre l'utilisation du glucose et de l'éthanol par la levure sont :

— le niveau des échanges respiratoires,

— le quotient respiratoire,

— les quantités respectives d'éthanol et de glucose consommées par unité de temps,

— l'augmentation de poids sec de la levure pendant l'expérience.

Ces évaluations sont faites d'abord avec du glucose et de l'éthanol non radioactifs, administrés isolément et en mélange. La comparaison des résultats obtenus dans chacun des cas, nous renseigne sur l'éventualité de l'oxydation simultanée de ces 2 substrats. Nous utilisons ensuite de l'alcool marqué au ^{14}C, alternativement sur l'un ou l'autre des carbones. Nous mesurons, au bout d'un temps déterminé, la distribution de la radioactivité dans chaque phase du milieu (air expiré, cellules de levure, liquide de suspension). Ces expériences effectuées en absence

et en présence de glucose, nous permettent d'établir si l'éthanol est utilisé en même temps que le glucose et de chiffrer cette éventuelle utilisation.

Dans un second chapitre, nous étudions les effets comparés d'une addition d'azote organique et d'azote minéral sur les échanges respiratoires résultant de l'utilisation du glucose et de l'alcool.

Nous discutons enfin l'ensemble des résultats obtenus

PLAN DE L'EXPOSÉ

Introduction.

Première partie : Matériel et Techniques utilisées.

Deuxième partie : Recherches concernant le comportement respiratoire de la levure en milieu dépourvu d'azote.

- Chapitre I. — Étude du comportement respiratoire de la souche de levure utilisée.
- Chapitre II. — Étude de l'influence de l'éthanol et du glucose sur la respiration endogène.
- Chapitre III. — Respiration en présence d'un mélange de glucose et d'éthanol exogènes.

Troisième partie : Recherches concernant l'influence de la présence d'azote dans le milieu sur le métabolisme du glucose et de l'éthanol chez la levure.

Discussion des résultats et conclusions.

PREMIÈRE PARTIE

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

I. Matériel

Nous avons utilisé, pour nos expériences, la levure de boulangerie « Saccharomyces cerevisiae ». Celle-ci provient des Laboratoires Springer à Maison-Alfort.

Ne possédant pas d'installation permettant la culture et l'entretien des souches dans de bonnes conditions, nous avons choisi cette marque après avoir apprécié la parfaite constance de ses propriétés respiratoires.

Cette levure est constituée par un Saccharomyces cerevisiae sélectionné, de même race que la levure de bière, obtenu par culture pure sur un milieu sucré, enrichi de produits azotés et phosphorés.

Sa teneur en matière sèche est de 30 p. cent environ. Les Établissements Fould-Springer nous assurent, la composition chimique suivante, évaluée sur une levure à 92 p. cent de matière sèche :

Protides	47,5 %	
Glucides	34,5 %	
Lipides	2 %	
Sels minéraux (dont 60 p. cent en moyenne en combinaison avec l'acide phosphorique)	7 %	
Eau	7 %	
Vitamine B_1 Thiamine	11 à 22	mg par kg
Vitamine B_2 Riboflavine	28 à 32	—
Vitamine PP Acide Nicotinique	350	—
Acide Pantothénique	120	—

La levure est utilisée environ 24 heures après sa récolte. Après lavage et centrifugation, elle est mise en suspension dans du tampon phosphate disodique monopotassique, de molarité M/15, à pH 5,0 préparé selon Soerensen (cf. Clark 1928). L'atmosphère gazeuse

utilisée est l'air, dans lequel nous avons constaté après quelques déterminations, un métabolisme des substrats équivalent à celui trouvé dans l'oxygène pur, à condition d'effectuer une agitation suffisante du milieu. Nos expériences sont réalisées à la température de 30°, hormis quelques essais d'orientation préliminaires effectués à la température du laboratoire.

Les substrats utilisés sont :

— Glucose R. P.
— Éthanol à 95°, à l'aide duquel nous préparons des solutions titrées.
— Éthanols marqués au ^{14}C sur le 1er ou sur le 2e carbone.
— Sulfate d'ammonium, et alpha-alanine R. P.

II. Techniques et Appareillage

A) MESURE DES ÉCHANGES RESPIRATOIRES

1° *Méthode du confinement et analyse des gaz :*

— La suspension de levure, mise en présence du substrat à oxyder, respire dans une enceinte hermétiquement close. Une agitation magnétique met en contact les cellules avec l'air atmosphérique enfermé dans le récipient, au sein duquel s'effectuent les échanges gazeux. La consommation d'oxygène dépend de la quantité de levure et de la quantité de substrat. La taille des récipients est choisie en fonction de ces deux facteurs et de la durée des expériences. Nous utilisons en général 250 mg de levure fraîche en suspension dans 100 ml de tampon. Des ballons compris entre 0,750 et 3 litres, suivant que l'expérimentation

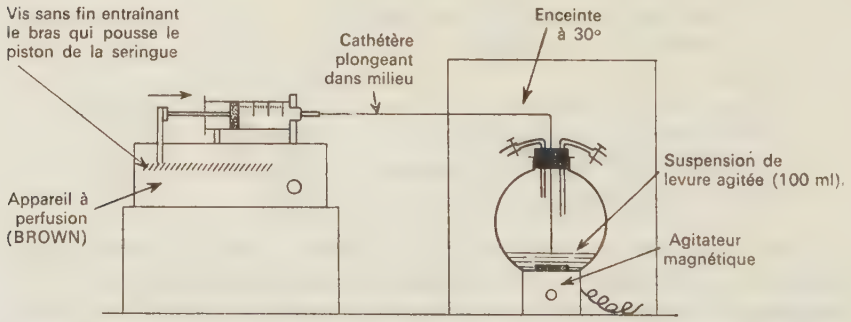


Schéma 1 : *Méthode du confinement et administration du substrat en perfusion continue.*

dure de 1 à 6 heures, permettent une oxygénation très largement suffisante avec le maximum de substrat que nous administrons. De plus, le confinement final varie dans de faibles limites, n'excédant jamais 1,5 pour cent de CO_2, ce qui n'entraîne aucune modification de la respiration. La fermeture des fioles est réalisée par des bouchons de caoutchouc comportant deux tubulures pour les prises d'air et une troisième pour l'admission de l'aliment. L'appareillage, reproduit sur le schéma 1, est placé dans une étuve pour maintenir la température constante. Au bout d'un temps déterminé, on effectue une prise d'air à l'aide d'une pipette à mercure de volume connu, en ayant soin de faire un brassage suffisant pour prélever un échantillon homogène.

— L'analyse de l'air confiné est faite avec un appareil de Carpenter (1933), qui donne une précision de l'ordre de 1 p. cent. La construction de cet appareil permet la détermination des volumes de gaz carbonique et d'oxygène contenus dans une partie aliquote d'air. Le CO_2 est absorbé par passages répétés à travers une colonne contenant une solution de KOH à 10 % et de la même manière l'oxygène est fixé par une solution de pyrogallol à 30 %. Compte tenu de la dilution apportée par la pipette permettant la prise d'air, des volumes respectifs de celle-ci et du récipient dans lequel l'expérience est faite, on détermine, par le calcul, la composition de l'air confiné prélevé. Par différence avec l'air atmosphérique initial, dont nous vérifions fréquemment la constance de composition, on obtient les quantités d'oxygène utilisées et de gaz carbonique rejetées par la levure.

Remarque : Le volume total de gaz carbonique dégagé par la respiration des cellules est égal à la somme : CO_2 retrouvé dans l'atmosphère gazeuse plus CO_2 dissous dans la suspension. Ce dernier est très faible par rapport au premier à pH = 5,0 et à 30°, conditions généralement utilisées dans ce travail. Toutefois, nous avons déterminé la valeur de ce CO_2 dissous en fonction de la pression partielle de ce gaz dans l'atmosphère confinée, et établi des abaques dont nous tenons compte dans nos résultats. Nous avons employé l'appareil de Van Slyke à volume constant (1940), pour ces déterminations.

2° *Techniques manométriques :*

Les mesures manométriques sont effectuées selon la méthode classique de Warburg.

L'appareil est construit par la Maison « Brown-Melsungen ». Les fioles, d'une capacité de 15 ml environ, renferment 2 ml de liquide (suspension de levure + solution de substrat). L'absorption du CO_2

est effectuée par 0,2 ml de KOH à 20 % introduite dans le compartiment central. Un accordéon de papier filtre de 1 cm_2 est placé dans la potasse pour augmenter la surface de contact. La solution de substrat qui est initialement contenue dans le diverticule latéral de la fiole est versée dans la suspension au temps zéro de la mesure des échanges respiratoires, après équilibration de la température dans la fiole. L'agitation des manomètres est de 180 oscillations par minute avec une amplitude de 7 cm.

Pour obtenir la mesure des volumes de CO_2 dégagés on utilise la méthode directe de Warburg, décrite par Umbreit et coll. (1951). La mesure est réalisée à l'aide de 2 fioles, l'une contenant de la potasse, l'autre n'en contenant pas. On tient compte des coefficients respectifs de solubilité de l'oxygène et du gaz carbonique et du volume exact de gaz contenu dans chaque fiole, pour évaluer par différence entre les lectures manométriques des 2 fioles, le volume de CO_2 dégagé. On peut ainsi calculer le quotient respiratoire.

3° *Méthode du circuit ouvert :*

Elle est utilisée dans le cas de la détermination du CO_2 radioactif dégagé lors de l'administration d'éthanol marqué au ^{14}C. Suivant cette technique, le CO_2 éliminé par la respiration de la levure est entraîné à travers une barbotteur de NaOH où il y a formation quantitative de CO_3Na_2. Le CO_3Na_2 est ensuite précipité par du Cl_2Ba sous forme de CO_3Ba.

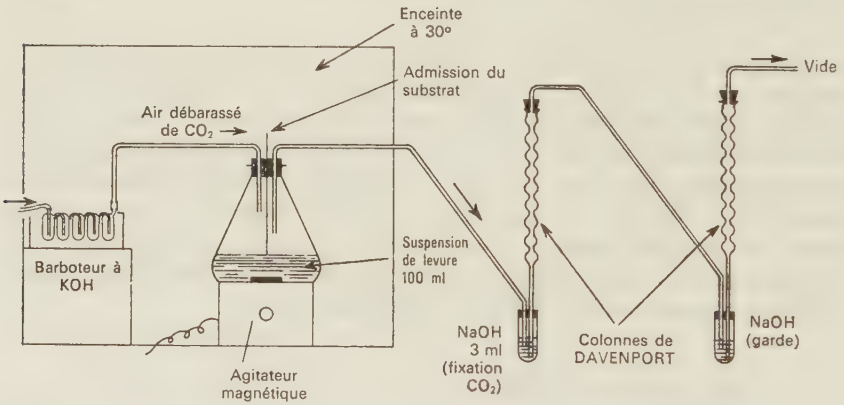


Schéma 2 : *Montage du circuit ouvert.*

L'appareil est monté suivant le schéma 2. Les 100 ml de suspension de levure, soumis à une agitation magnétique, sont contenus dans une fiole à fond large de 250 ml, fermée par un bouchon à tubulures, dans

laquelle le substrat est introduit en perfusion. Ce récipient est relié, par l'intermédiaire de colonnes d'absorption de DAVENPORT, à deux tubes coniques disposés en série et contenant chacun 3 ml de NaOH 2,5 N. Le dernier tube est connecté à une trompe à vide dont le débit est de l'ordre de 30 litres à l'heure. Le courant d'air est débarrassé du gaz carbonique atmosphérique à l'entrée du circuit par un barbotteur à KOH. L'air passe dans le récipient contenant la levure et entraîne dans la soude, le CO_2 produit par la respiration, au fur et à mesure de son dégagement. Les conditions d'aération assurent une respiration correcte. Le débit de l'air, le volume et la concentration de la soude permettant la fixation quantitative du CO_2 dans le premier tube de NaOH dans des limites déterminées. Cette soude peut être changée et remplacée par une solution fraîche, chaque fois que cela est nécessaire, pour suivre l'évolution de la respiration. Le second barbotteur à NaOH ne sert que de garde. (On vérifie qu'il ne contient pas de CO_2). De plus, le 1er tube conique, où le CO_2 se trouve sous forme de CO_3Na_2, va être directement utilisé pour la précipitation et la centrifugation ultérieure, ainsi les pertes qui seraient dues à un transvasement sont évitées.

Dosage pondéral du CO_2 sous forme de carbonate de baryum.

La solution de NaOH contenant le CO_2 est additionnée à chaud d'une solution de Cl_2Ba. Le précipité de CO_3Ba se forme immédiatement. Il est centrifugé et débarrassé de l'excès de NaOH et de Cl_2Ba par trois lavages successifs : à l'eau chaude, à l'eau froide et à l'acétone. Il est ensuite recueilli sur des filtres tarés, puis séché à l'étuve à 110°. Après pesée, on calcule le volume de CO_2 présent.

B) TECHNIQUES D'ADMINISTRATION DES SUBSTRATS

1° *Administration de la totalité du substrat à la suspension de levure, par simple mélange au départ de l'expérience.*

C'est de cette façon que nous avons réalisé les expériences préliminaires sur le comportement respiratoire de la souche de levure.

2° *Admission continue et régulière du substrat dans le milieu de suspension pendant toute la durée de l'expérience.*

La solution de substrat est contenue dans une seringue placée sur un appareil à perfusion de « BROWN ». Cette seringue est reliée à la suspension de levure par un cathétère de nylon qui traverse le bouchon de

la fiole et plonge dans la suspension. Le mécanisme du perfuseur injecte régulièrement l'aliment à une vitesse déterminée. Celle-ci est réglée définitivement de façon à infuser 1 ml de solution à l'heure. C'est sur la concentration de la solution que nous agissons pour introduire des quantités variables de substrat dans nos différentes expériences. Nous avons représenté sur le schéma 1, le dispositif d'administration du substrat.

La quantité de substrat introduite est exprimée en millimoles (mM), reçues par un gramme de levure sèche en une heure.

C) DÉTERMINATION DES QUANTITÉS DE GLUCOSE ET D'ÉTHANOL UTILISÉES PAR LA LEVURE :

C'est la différence entre les quantités totales de substrat administrées et retrouvées dans le milieu de suspension à la fin de l'expérience.

1° *Dosage du glucose par la méthode de* ***HANES*** (1929).

Il s'agit d'une adaptation de la méthode de Hagedorn-Jensen au dosage de petites quantités de glucose allant jusqu'à 3,8 mg par prise.

Le glucose réduit quantitativement une solution de ferricyanure en ferrocyanure, à chaud, en milieu alcalin. L'excès de ferricyanure non réduit est dosé par iodométrie. Après addition de IK en milieu acide, l'iode est libéré à raison d'un atome d'iode pour une molécule de ferricyanure présent suivant la réaction d'équilibre :

$$[Fe\ (CN)_6]\ H_3 + IH \rightarrow [Fe\ (CN)_6]\ H_4 + I$$

Pour rendre la réaction complète dans le sens de la formation d'iode, on bloque le ferrocyanure à l'état de combinaison zincique insoluble. L'iode libéré est dosé par une solution titrée de thiosulfate de sodium. On effectue également un témoin sans glucose dont on défalque la valeur. Nous avons établi les abaques permettant de connaître la correspondance entre la quantité de thiosulfate N /100 utilisée en ml, et la quantité de glucose en mg présente dans le milieu. Le dosage est exécuté après déprotéinisation de la suspension de levure par la précipitation cadmique de Dumazert (1936). Les abaques sont établies en réalisant toutes les opérations sur une suspension de levure déprotéinisée en absence et en présence de quantités de glucose connues.

2° *Dosage de l'éthanol par la méthode de NICLOUX* (1931).

La totalité, ou une partie aliquote, du milieu de suspension est rapidement distillée dans un appareil de Schloessing-Aubin, jusqu'à

obtention d'un volume de distillat égal au moins à la moitié du volume initial. Ainsi tout l'alcool contenu dans la prise est recueilli.

La méthode de Nicloux est basée sur l'oxydation quantitative de l'alcool éthylique en acide acétique. Celle-ci est réalisée à chaud par du bichromate en excès. Il s'agit d'un dosage par double retour. Le bichromate non utilisé est réduit par du sel de Mohr (sulfate ferreux). L'excès de sel de Mohr est titré à son tour par du permanganate de potassium. Chaque dosage d'alcool s'accompagne d'un témoin permettant de défalquer les quantités de substances réductrices contenues dans les réactifs employés. Ce témoin permet également un contrôle permanent du titre de la solution de sel de Mohr qui est assez instable et doit être refaite fréquemment. D'après Nicloux, cette technique permet une précision de l'ordre de 3 p. mille pour des quantités allant jusqu'à 5 mg par prise.

3° *Dosage de l'alcool marqué au* ^{14}C :

Il y a 3 temps dans ce dosage :

— Oxydation complète de l'éthanol en $^{14}CO_2 + H_2O$.
— Précipitation du CO_2 formé en $^{14}CO_3Ba$.
— Mesure de l'activité du $^{14}CO_3Ba$.

a) Oxydation persulfurique de l'éthanol :

L'oxydation se fait en solution aqueuse par du persulfate de potassium additionné de nitrate d'argent servant de catalyseur. L'opération s'effectue à la température de 70° amenée progressivement à 100° C.

L'appareil utilisé a été mis au point par Dontcheff (1953). Il dérive de celui d'Osburn et Werkman (1932). Dontcheff l'a adapté à la mesure de la radioactivité de l'éthanol pour permettre les précisions qu'il décrit. Le CO_2 formé est entraîné dans une colonne d'absorption de Davenport où il est fixé sur de la soude en excès sous forme de CO_3Na_2.

b) Précipitation du carbonate de sodium formé en carbonate de baryum :

Cette méthode est décrite précédemment (cf. p. 17 Méthode du circuit ouvert).

Nous insisterons seulement ici sur le soin qu'il faut apporter à la répartition du précipité sur les porteurs où il est recueilli. En effet,

c'est sur ces porteurs que s'effectue la mesure de la radioactivité. Le ^{14}C émet un rayonnement béta de faible énergie, une partie de cette énergie est absorbée par le baryum, métal à poids atomique élevé. Il convient donc d'assurer la constance de cette self-absorption du précipité, en le répartissant uniformément sur une surface délimitée, exactement connue. DONTCHEFF a spécialement étudié les porteurs à cet effet. Ceux-ci permettent à la fois filtration du précipité, répartition uniforme, lavage, séchage, pesée précise, comptage des impulsions et rendent toutes les mesures comparables.

c) Mesure de la radioactivité :

Établissement de la courbe de self-absorption :

Puisque le précipité est uniformément réparti, la grandeur de la self-absorption est fonction du poids de substance par cm^2 (T). Elle est donnée par la relation $F(T) = e^{-\mu T}$ où μ est une constante dépendant du corps considéré. D'après LIBBY (1947), dans le cas du CO_3Ba, $\mu = 0{,}285$. Le pourcentage d'activité totale en fonction de l'épaisseur s'exprime par la relation $J(T) = \frac{1 - e^{-\mu T}}{\mu T}$. Cette fonction est représentée par une courbe, dont l'ordonnée à l'origine est 1, c'est-à-dire, l'activité totale du ^{14}C pour une épaisseur tendant vers zéro.

Dans toutes nos expériences, nous effectuons la précipitation du CO_3Ba dans des conditions rigoureusement identiques sur des porteurs calibrés ayant exactement la même surface. Ainsi, la self-absorption exprimée en pourcentage d'activité totale, ne dépend que du poids du précipité. Il est alors possible de construire la courbe qui représente le pourcentage d'impulsions reçues sur le compteur par rapport à l'activité totale, en fonction du poids du précipité de $^{14}CO_3Ba$. Ces données sont valables pour un quelconque précipité de $^{14}CO_3Ba$, quelle que soit son activité, pourvu que le mode opératoire ne change pas. A l'aide d'une solution de carbonate de sodium d'activité constante, nous préparons selon la technique décrite, une gamme de précipités de $^{14}CO_3Ba$ de poids croissants allant jusqu'à 100 mg. Nous portons sur une courbe, en abscisses, le poids du précipité, et en ordonnées, le nombre d'impulsions-minute reçues sur le compteur, rapporté au mg de CO_3Ba pour chaque précipité. L'intersection de cette courbe avec l'axe des « y » représente l'activité spécifique totale du $^{14}CO_3Ba$, car ici le poids tendant vers zéro, la self-absorption devient négligeable.

A partir de cette donnée, il est possible alors de calculer pour chaque poids de précipité contenu sur chaque porteur, le pourcentage

de l'activité trouvée par rapport à l'activité totale du CO_3Ba. Ce sont ces valeurs que nous portons en ordonnées sur la figure (1) pour tracer la courbe de self-absorption.

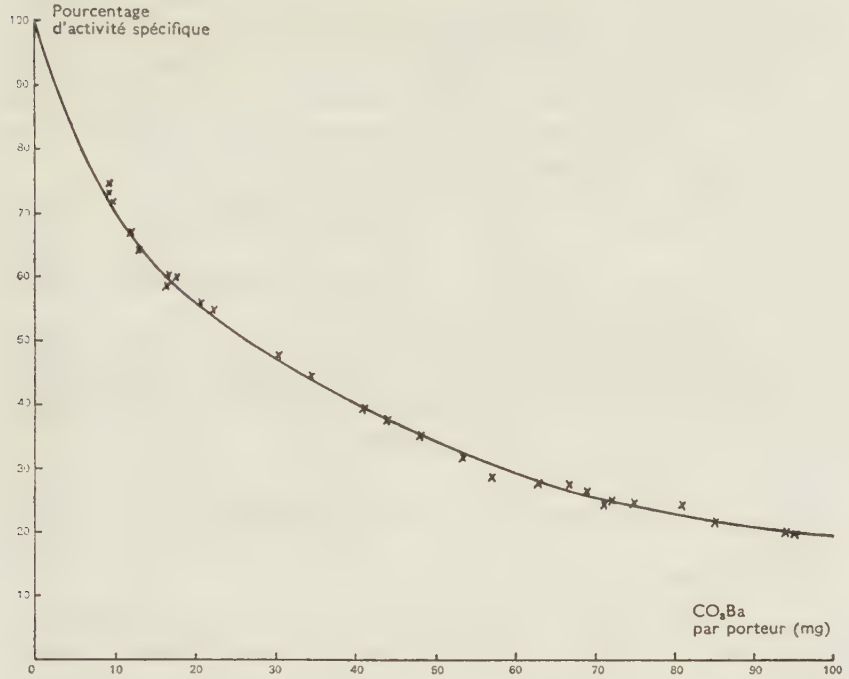


Figure 1 : *Courbe de self-absorption de CO_3Ba.*

Pour connaître l'activité totale du carbone contenu dans un précipité, il suffit de multiplier le nombre d'impulsions déterminées expérimentalement par l'inverse de ce pourcentage.

D. IDENTIFICATION ET DOSAGE DE L'ACIDE ACÉTIQUE PAR LA MÉTHODE DE PRÉVOT (1954)

Après acidification à un pH convenable, le milieu à analyser est soumis à un entraînement à la vapeur, jusqu'à ce que la totalité des acides volatils soit recueillie. Un volume de 110 ml de la solution ainsi obtenue est redistillé. On recueillie le nouveau distillat en 10 fractions successives de 10 ml chacune. Chaque prise (et ses 2 rinçages) est

neutralisée à la burette par de l'eau de chaux jusqu'à virage léger de la phénolphtaléine.

On dresse la courbe de distillation fractionnée de la façon suivante : chacun des dix points est obtenu en multipliant le volume d'eau de chaux utilisé après neutralisation des prises successives, par le coefficient obtenu en divisant 100 par le total d'eau de chaux employée.

Chaque acide gras volatil possède une courbe de distillation fractionnée de forme caractéristique qui permet son identification. Ainsi pour l'acide acétique pur, les tables dressées par PRÉVOT, selon DUCLAUX, donnent les valeurs suivantes :

10 ml	20 ml	30 ml	40 ml	50 ml	60 ml	70 ml	80 ml	90 ml	100 ml
7,4	15,2	23,4	32,0	40,9	51,0	60,8	72,2	85,5	100,0

Cette méthode permet également de reconnaître un mélange de deux acides gras volatils en proportions variables.

Nous opérons dans les conditions décrites, avec la solution d'acide à identifier et nous comparons les résultats obtenus aux tables de Prévot. (Avec des acides témoins purs nous trouvons des chiffres coïncidant exactement avec ces tables.)

E. ÉTUDE QUANTITATIVE DES RÉSERVES FORMÉES

1° *Évaluation des poids secs.*

La prise de suspension cellulaire est lavée 3 fois par centrifugation dans de l'eau distillée glacée. Le culot est séché jusqu'à poids constant dans l'étuve à 110°. La pesée est effectuée directement dans le tube à centrifuger taré.

2° *Détermination des produits radioactifs retenus dans la levure lors de l'utilisation de l'éthanol marqué :*

Immédiatement après la fin de l'expérience, la suspension de levure est centrifugée 2 minutes, le culot est lavé 2 fois à l'eau glacée, centrifugé à nouveau, puis rapidement soumis à l'oxydation persulfurique.

L'oxydation est réalisée selon la technique et avec l'appareillage utilisés pour l'oxydation de l'alcool marqué. En fin d'opération la solution est parfaitement limpide et nous avons vérifié avec des suspensions de levure de concentrations différentes la constance des résultats.

Le CO_2 obtenu est précipité en CO_3Ba, son volume et sa radioactivité sont déterminés comme nous venons de le décrire.

L'intérêt de cette méthode est de mesurer la radioactivité retenue dans la levure d'une façon tout à fait comparable à la méthode utilisée pour doser l'éthanol marqué.

F. ÉVALUATION DE LA MATIÈRE VIVANTE PAR EXAMEN DIRECT DES CELLULES AU MICROSCOPE

Il s'agit de vérifier qu'il ne se produit pas de prolifération cellulaire, ni de mortalité des cellules mises en œuvre au cours de nos expériences, c'est-à-dire que le nombre des cellules vivantes reste constant.

1° *Bourgeonnement.*

Grossies 400 fois, les cellules se voient assez nettement pour vérifier qu'il n'y a pas de bourgeonnement au cours de nos expériences.

2° *Numération des cellules.*

Elle s'effectue à l'aide de l'hématimètre de Malassez, sur une suspension homogène à la concentration de 2 g pour 1 000 de levure fraîche, qui permet le dénombrement d'environ 200 cellules pour 1 centième de mm^3.

La proportion de cellules mortes est déterminée par coloration au bleu de méthylène au 1/4000 d'après Fink (1931). Celle-ci reste toujours inférieure à 1 p. cent de la population totale, elle est donc négligeable.

G. ABRÉVIATIONS UTILISÉES

QO_2 : Nombre de ml d'oxygène absorbés pendant 1 heure, par g de poids sec de la préparation.

QCO_2 : Nombre de ml de gaz carbonique dégagés pendant 1 heure, par g de poids sec de la préparation.

Q.R. : Quotient respiratoire : rapport du volume de gaz carbonique dégagé au volume d'oxygène absorbé.

Vol. O_2 substrat ou O_2 substrat : volume d'oxygène réellement consommé, pendant l'oxydation de la quantité de substrat qui disparaît du milieu.

Vol. CO_2 substrat ou CO_2 substrat : volume de gaz carbonique réellement dégagé pendant l'oxydation de la quantité de substrat qui disparaît du milieu.

Rapport d'oxydation des substrats : Rapport entre le volume d'oxygène utilisé par la levure pendant l'oxydation d'un substrat, et le volume d'oxygène théorique qui serait nécessaire à l'oxydation complète en CO_2 et H_2O, de cette même quantité de substrat.

mM/h/g : Vitesse d'administration des substrats, exprimée en millimolécules de substrat que reçoit en 1 heure, 1 g de levure sèche.

H. PRÉCISION DES RÉSULTATS

Les valeurs moyennes obtenues pour chaque série expérimentale sont accompagnées de leur intervalle de sécurité, pour une probabilité de 95 p. cent : $m \pm \frac{2\sigma}{\sqrt{n}}$.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES CONCERNANT LE COMPORTEMENT DE LA LEVURE EN MILIEU DÉPOURVU D'AZOTE

CHAPITRE PREMIER

ÉTUDE DU COMPORTEMENT RESPIRATOIRE DE LA SOUCHE DE LEVURE UTILISÉE

I. Respiration en présence soit de glucose, soit d'éthanol. Détermination de l'influence du mode d'administration des substrats.

Dans ces premiers essais, nous avons cherché à déterminer les relations existant entre la quantité de substrat administrée et les échanges respiratoires des cellules de levure.

Nous avons administré à la levure, différentes quantités de glucose ou d'éthanol et suivi l'évolution des échanges gazeux et du quotient respiratoire au cours de leur utilisation.

Ces expériences ont été effectuées suivant la méthode du confinement à la température du laboratoire 20-22°. Nous les résumons brièvement.

A. Respiration de la levure en présence de glucose.

1° *Administré en totalité au début de l'expérience.*

Comme nous l'avons déjà noté, lorsque ce substrat est métabolisé en aérobiose, la présence d'oxygène entraîne une inhibition partielle de la fermentation, mais non sa suppression complète. Il est donc intéressant de connaître l'aspect de la superposition de ce reste de fermentation à la respiration. Nous avons observé les phénomènes suivants :

a) *L'intensité de l'activité respiratoire* est fonction de la concentration du glucose présent dans le milieu. Cette fonction est linéaire tant que le sucre se trouve en quantité suffisante. Son épuisement amène une chute progressive du volume d'oxygène absorbé.

b) *L'intensité de l'activité fermentaire* dépend aussi de la concentration initiale du glucose dans le milieu. Le dégagement de gaz carbonique est instantané, il a lieu immédiatement après l'administration du sucre. L'élimination de CO_2, plus ou moins élevée au départ suivant la quantité de glucose administrée, décroît progressivement tout au long de l'expérience.

c) *La courbe exprimant le quotient respiratoire* en fonction du temps, rend compte de l'évolution des échanges gazeux.

Ainsi que nous le voyons sur la figure 2, ce quotient respiratoire a trois niveaux successifs :

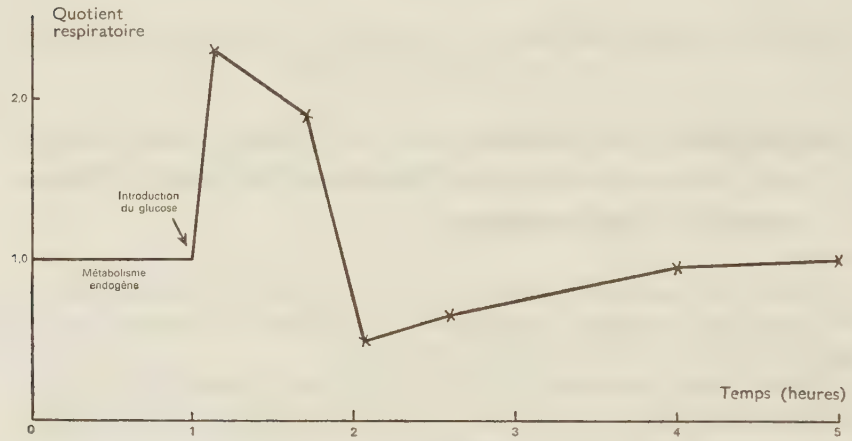


Figure 2 : *Cinétique du quotient respiratoire de la levure en présence de glucose.*
Glucose : 200 mg administrés en totalité au début de l'expérience.
Levure utilisée : 1250 mg (poids sec), dans 100 ml de tampon phosphate selon Sœrensen à pH : 5. Température : 20° C.

1. Q.R. supérieur à 1,0 qui traduit la fermentation.

Plus il y a de glucose dans le milieu, plus la valeur du Q.R. est élevée et plus elle reste longtemps supérieure à l'unité.

Au cours de cette première phase, dans le paramètre : $\frac{QCO_2}{QO_2} = Q.R$, le QO_2 reste fixe, le QCO_2 seul varie déterminant la valeur du quotient respiratoire.

2. Q.R. inférieur à 1,0 :

Quand la fermentation a été importante, l'oxydation de l'alcool formé abaisse le Q.R. au-dessous de 1,0, le QCO_2 devenant inférieur au QO_2.

3. Q.R. égal à 1,0 :

Les valeurs des QCO_2 et QO_2 tendent à se rejoindre et baissent parallèlement jusqu'au niveau endogène.

La valeur du quotient respiratoire pendant les 2 premières phases de l'expérience s'écarte d'autant plus de 1,0 que la concentration initiale du glucose est élevée, donc la fermentation importante.

Lorsque cette concentration se situe autour de 1 pour 1000, le quotient respiratoire demeure proche de l'unité pendant toute la durée de l'expérience. Il apparaît donc possible de réduire à son minimum la fermentation en administrant le glucose à une concentration initiale d'environ 1 pour 1000. Mais à ce moment, nous assistons à une chute très rapide de la consommation d'oxygène. Cependant une recharge du milieu en sucre, compensant en permanence sa disparition, maintient le niveau des échanges gazeux à sa valeur initiale, sans entraîner de modification du quotient respiratoire.

2° *Mode d'administration du substrat : On adopte la perfusion continue et régulière.*

Nous ne voulons pas employer d'inhibiteurs de fermentation, ceux-ci étant susceptibles de modifier le métabolisme de la levure. Nous restons dans des conditions strictement physiologiques et, pour éviter la fermentation, nous administrons le glucose, non pas en totalité au départ de l'expérience, mais *en perfusion continue et régulière pendant toute la durée de l'expérience*, suivant la méthode que nous avons décrite dans le chapitre des techniques.

Remarque :

Signalons encore que le glucose n'est pas complètement oxydé par la levure en CO_2 et H_2O. Ce phénomène a été constaté depuis longtemps par différents auteurs : Lundin (1923), Pickett et Clifton (1943), Clifton (1946) et (1952). Une part importante du glucose échappe à l'oxydation immédiate, seul le tiers du glucose administré est oxydé complètement en CO_2.

B. Respiration de la levure en présence d'éthanol.

1° *Administré en totalité au début de l'expérience.*

L'intensité de l'activité respiratoire est fonction de la quantité d'alcool présente dans le milieu. L'appauvrissement du milieu en éthanol, résultant de sa consommation, entraîne la chute des échanges respiratoires.

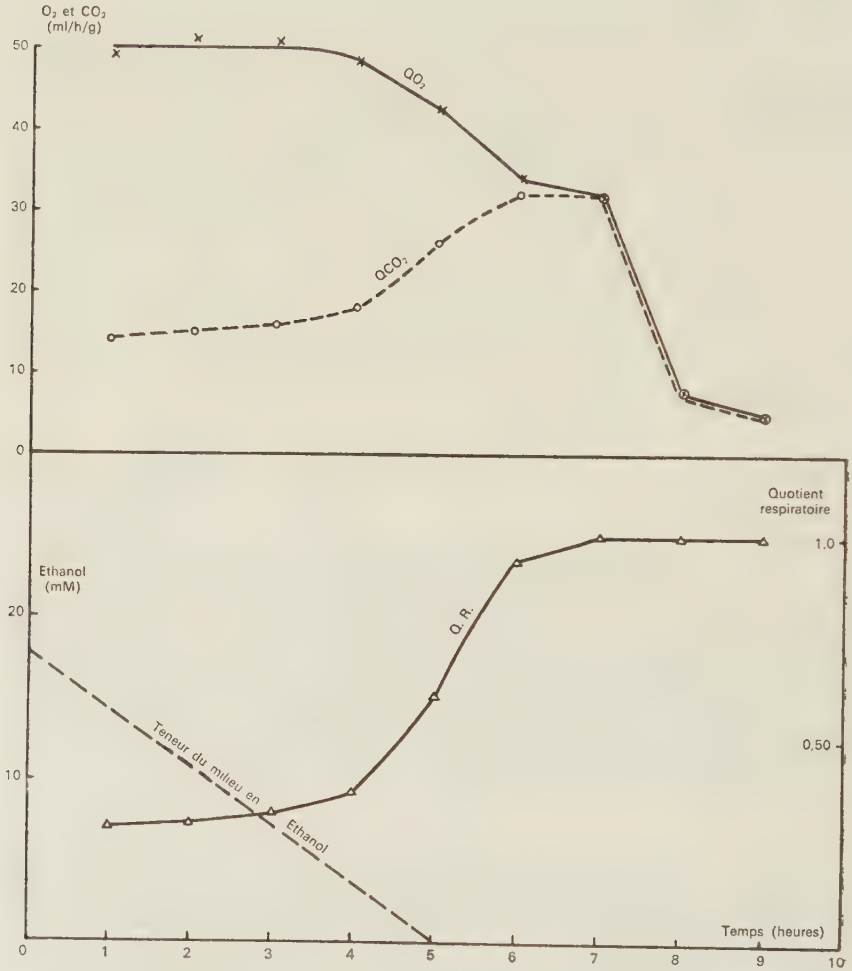


Figure 3 : *Cinétique des QO_2 et QCO_2,*

Figure 3 bis : *Cinétique du Q.R. et de la teneur en alcool du milieu pour une levure ayant reçu 16,5 m M d'éthanol, administrées en totalité au début de l'expérience.*
Levure utilisée : 450 mg (poids sec), dans 200 ml de tampon phosphate selon Sœrensen à pH : 5. Température 20° C.

Il est intéressant de suivre, en fonction du temps, l'évolution de l'oxygène consommé, du gaz carbonique dégagé et du quotient respiratoire.

Pour une quantité importante d'éthanol : 16,5 mM, administrée en totalité au début de l'expérience, il ressort de l'examen des figures 3 et 3 *bis* :

a) Une active intensité respiratoire pendant les trois premières heures environ. Le QO_2 reste élevé et invariable tant que l'éthanol est présent en quantité suffisante dans le milieu.

De même le QCO_2 est à un niveau constant, mais sa valeur est beaucoup plus faible que celle du QO_2. Le Q.R. qui en résulte est égal à 0,35, chiffre très inférieur à 0,67 (Q.R. correspondant à l'oxydation complète de l'éthanol en CO_2 et H_2O), fait déjà constaté par Meyerhof (1925).

b) Ensuite, le QO_2 s'abaisse et le QCO_2 s'élève jusqu'à ce que leurs valeurs se rejoignent, et l'on constate un accroissement continu du Q.R., qui atteint l'unité tandis que l'éthanol achève de disparaître du milieu.

c) Enfin, la chute des échanges respiratoires jusqu'au niveau endogène s'effectue avec QO_2 et QCO_2 superposés, soit avec un Q.R. égal à 1,0.

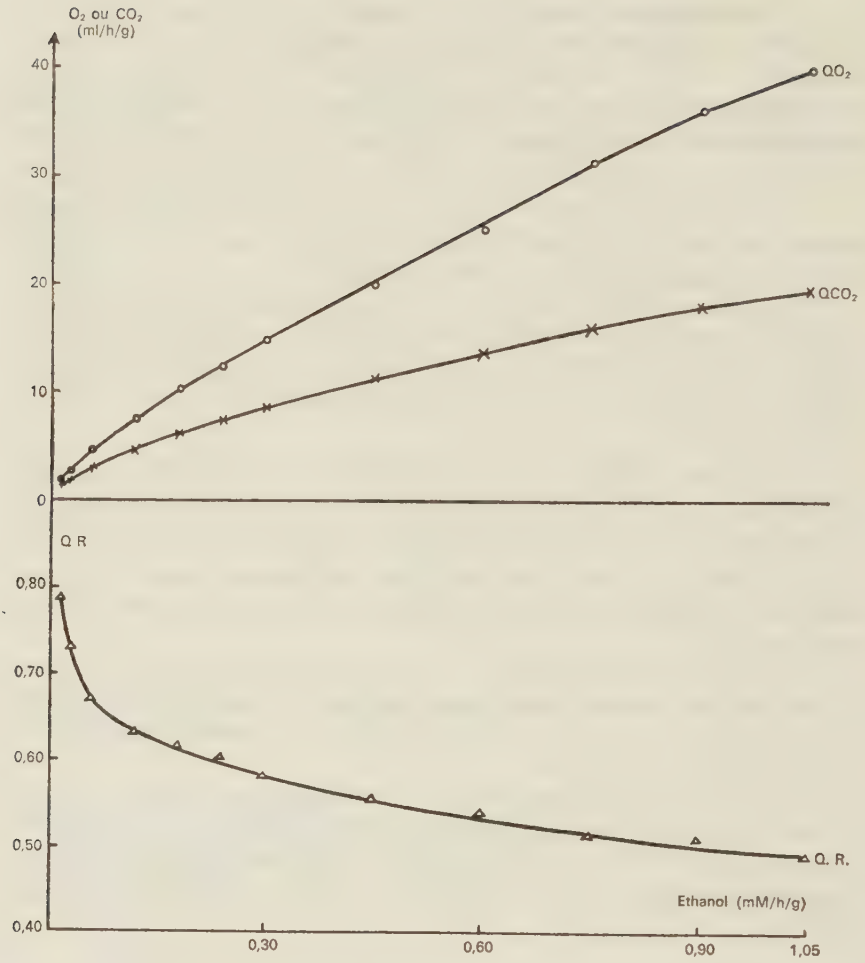
Il semble donc que l'alcool est transformé en un produit intermédiaire, qui est ensuite oxydé avec un quotient respiratoire égal à 1. Selon Novelli et Lipmann (1950), Martius et Lynen (1950), l'alcool est transformé en acétate.

Nous remarquons encore que la consommation totale d'oxygène ne rend pas compte de l'oxydation complète de l'alcool. Le Q.R. global reste inférieur à 0,67 et le rapport d'oxydation inférieur à l'unité. De plus ces facteurs varient en fonction de la quantité d'éthanol administrée.

2° *Administré en perfusion régulière et continue à différentes vitesses.*

Nous avons introduit l'alcool en perfusion continue comme nous l'avons fait avec le glucose.

Les vitesses d'administration des solutions introduites varient de 0,15 à 1 mM/h/g de levure sèche; la durée des expériences est de 7 heures. Pour chaque expérience, nous obtenons rapidement des échanges qui se stabilisent à un niveau constant pendant toute la durée de l'infusion du substrat. Ce niveau est fonction de la vitesse d'administration de l'éthanol. Il en est de même pour le quotient respiratoire. Nous avons porté sur les figures 4 et 4 *bis*, les QO_2, QCO_2 et Q.R. moyens correspondant aux différentes vitesses d'infusion de l'alcool. Il ressort que :



Figures 4 et 4 bis : *Influence de la vitesse d'administration de l'éthanol sur les échanges et le quotient respiratoires*

Levure utilisée : 450 mg (poids sec), dans 200 ml de tampon phosphate selon Sœrensen à pH : 5. Température : 20° C.

a) Les échanges respiratoires augmentent régulièrement en même temps que la vitesse d'administration de l'alcool augmente.

b) Le quotient respiratoire d'abord égal et même supérieur à 0,67 (quotient respiratoire correspondant à une oxydation complète de l'éthanol), s'abaisse régulièrement tandis que croît la quantité de substrat administrée.

Les valeurs supérieures à 0,67 doivent s'expliquer par l'interférence du métabolisme endogène, nous reviendrons sur cette question. Il ressort de l'examen de la courbe, qu'avec très peu d'alcool l'oxydation est complète. Cependant, en général, l'alcool métabolisé par la levure est incomplètement dégradé en CO_2 et H_2O. Cette oxydation incomplète est une donnée essentiellement variable, fonction de la concentration de la solution d'alcool administrée.

C. Conclusion :

La méthode d'administration des substrats sous forme d'infusion continue présente un grand intérêt. Celle-ci nous permet :

— Avec le glucose, de limiter au maximum la possibilité de fermentation et d'obtenir, pendant un temps suffisamment long, un Q.R. égal à l'unité et des échanges gazeux élevés.

— Avec l'alcool, de limiter la variation du Q.R. au cours de l'expérience et d'obtenir également pendant toute une période de temps, des échanges respiratoires élevés.

Cette technique a été utilisée pour suivre parallèlement le métabolisme du glucose seul, de l'éthanol seul et du mélange de ces deux substrats, afin d'étudier les rapports existant entre l'utilisation du glucose et de l'éthanol par la levure.

II. Respiration endogène.

A. Définition :

En aérobiose, la levure mise en suspension dans de l'eau ou dans une solution tamponnée, sans aucune addition de substrat exogène, consomme de l'oxygène et dégage du gaz carbonique.

L'ensemble des réactions d'oxydation qui assurent dans ces conditions la survie de la levure et le maintien de son intégrité cellulaire constitue le métabolisme endogène. Celui-ci résulte de la dégradation de certains composants de la cellule.

Aussi avons-nous mesuré l'intensité des échanges gazeux endogènes et calculé le quotient respiratoire qui nous renseigne sur la nature des substances de réserves oxydées.

B. Historique :

Les travaux relatifs au métabolisme endogène mettent en évidence la complexité du problème. L'identification des substances de réserves dégradées au cours de la respiration endogène a donné lieu à beaucoup

de controverses. La majorité des chercheurs sont d'accord pour admettre que les hydrates de carbone constituent *le* substrat endogène. Les preuves en sont : le Q. R. égal à 1,0 le plus généralement observé, ainsi que la proportionnalité entre le CO_2 dégagé et la diminution du taux de glycogène endocellulaire. C'est le résultat des études cinétiques de Stier et Stannard (1936) (1937), des travaux de Spiegelman et Nozawa (1945) et plus récemment de Eaton (1959) et (1960)

Notons en passant que ces réserves glucidiques, sont également fermentescibles en anaéroliose. Ce fait, contesté par les premiers auteurs, a été mis en évidence par Fales (1951), Chester (1959) et Eaton (1960).

D'après Eaton, la respiration endogène se produit au dépens de 2 substrats glucidiques, l'utilisation de chacun d'eux étant gouvernée par des réactions de premier ordre. L'un des substrats est plus rapidement oxydé que l'autre (ce phénomène se retrouve également dans le cas de la fermentation). Cet auteur a postulé l'existence de deux « pools » de glycogène métaboliquement distincts. L'ultracentrifugation du glycogène de la levure révèle, en effet, l'existence de 2 fractions. Cependant, la correspondance étroite entre le tréhalose, ces deux fractions de glycogène et la respiration ou la fermentation endogène n'est pas encore parfaitement établie.

D'autres auteurs, ont attribué la respiration endogène à des catégories différentes de réserves. Stickland (1956) a obtenu un Q.R. de 0,83 et en a déduit que les lipides étaient utilisés. Gronlund et Campbell (1961), ont pensé que les amino-acides libres servent de substrat et Halvorson a observé (1958) des dégradations de protéines et d'acides nucléiques libres.

Dans un exposé général sur le métabolisme endogène de Saccharomyces cerevisiae et de quelques autres microorganismes, Dawes et Ribbons (1962) font apparaître que plus d'un substrat pouvant être dégradé, les conditions de culture et de milieu sont certainement responsables de l'utilisation préférentielle de l'un d'entre eux.

Il ressort de cet aperçu bibliographique que suivant la souche, le milieu de culture et les conditions expérimentales, le métabolisme endogène peut présenter des aspects différents. Il est donc indispensable d'étudier la respiration endogène de la levure que nous avons nous-mêmes employée.

C. Étude de la respiration endogène de la souche de levure utilisée.

1° *Conditions expérimentales.*

Nous utilisons la méthode du confinement. Les échanges respiratoires endogènes ont une faible intensité. Pour mettre en jeu des volumes gazeux suffisamment importants, il nous faut donc utiliser une quantité

assez grande de levure : 3 g de poids sec et opérer à 30°. Ceci entraîne des consommations d'O_2 et des dégagements de CO_2 assez élevés pour réduire les erreurs relatives.

Nous avons vérifié, avec des suspensions de levure de concentrations croissantes, qu'il y a une relation linéaire entre la vitesse des échanges gazeux et la quantité de cellules à condition que celle-ci ne soit pas trop élevée. Avec une suspension de 3 g de levure sèche dans 100 ml, l'aération est largement suffisante.

Nous suivons l'évolution de la respiration au cours du temps : 4 prises d'air successives sont faites pendant les 8 heures que dure l'expérience.

2° *Résultats :*

Nous avons tracé sur la figure 5 l'évolution du QO_2 dans le temps. La consommation d'oxygène s'abaisse progressivement au fur et à

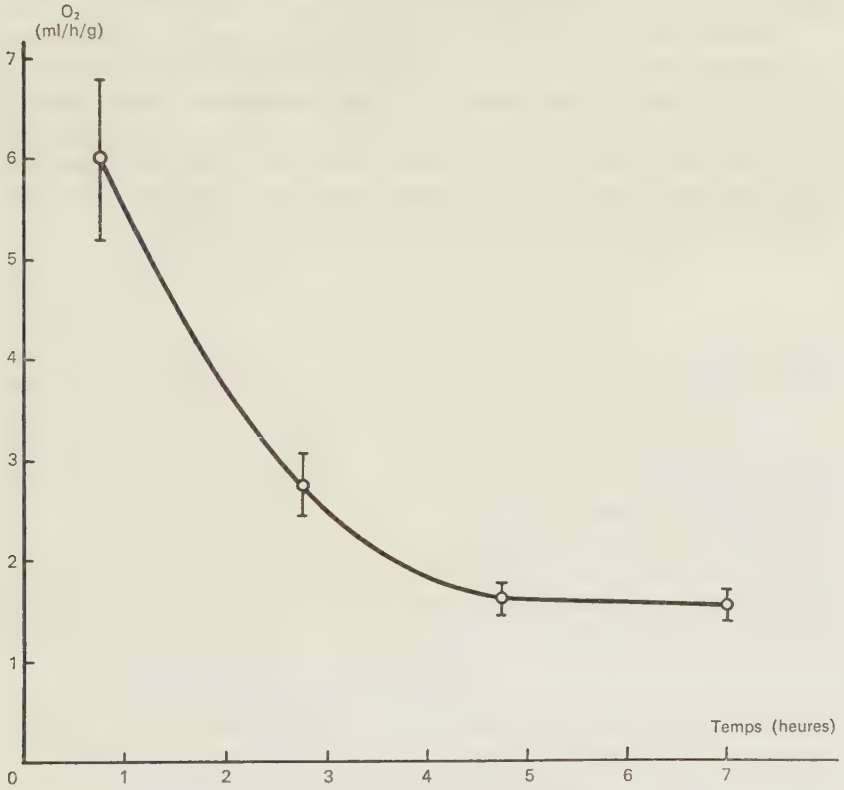


Figure 5 : *Cinétique du QO_2 endogène.*
Levure utilisée : 3 g (poids sec) dans 100 ml de tampon phosphate selon Sœrensen à pH : 5.
Température : 30° C
Les traits verticaux indiquent l'intervalle de confiance de la moyenne pour une probabilité de 95 %.

mesure que les réserves s'épuisent. Le quotient respiratoire reste toujours voisin de 1,0 pendant toute la durée des expériences. Il traduit la combustion de métabolites de type glucidique. Nous remarquons pendant les 4 premières heures, un abaissement rapide du niveau des échanges respiratoires. Pendant les heures suivantes, la courbe prend l'allure d'une droite de pente très faible, presque parallèle à l'axe des abcisses.

III. Conclusions sur le comportement respiratoire de la levure utilisée.

Nous connaissons maintenant le comportement respiratoire de la levure. Nous savons d'une part, que non alimentée elle survit grâce à l'utilisation de réserves glucidiques.

D'autre part, nous avons déterminé les caractères principaux de sa respiration en présence de substrats exogènes : alcool et glucose.

En fonction de ces données, et des conditions expérimentales que nous avons établies, il nous est possible d'aborder l'étude du problème qui nous préoccupe : à savoir, quelle part prendra l'énergie de l'oxydation de l'éthanol chez une levure respirant en régime glucidique, qu'il s'agisse de glucides endogènes ou de glucose exogène.

CHAPITRE II

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE L'ÉTHANOL ET DU GLUCOSE SUR LA RESPIRATION ENDOGÈNE

I. Considérations générales.

Nous voulons savoir si l'énergie provenant de l'oxydation des substrats exogènes se substitue à celle des réserves que la levure utilise pour son métabolisme endogène, en particulier si l'éthanol peut se substituer à ces réserves glucidiques de la levure.

D'autre part, il nous est nécessaire de savoir si la respiration endogène persiste lors de l'utilisation de substrats exogènes, c'est-à-dire, si lorsque nous voulons considérer les échanges gazeux relatifs à la consommation de ces substrats, il convient ou non de défalquer des résultats obtenus, les chiffres correspondant à la respiration endogène.

II. Conditions expérimentales.

Afin de pouvoir distinguer les échanges gazeux provenant du métabolisme endogène de ceux de la respiration en présence de substrats exogènes, nous nous plaçons dans les conditions suivantes :

La quantité de substrat administrée en perfusion continue est telle que son oxydation corresponde à une consommation d'oxygène du même ordre de grandeur que celle de la respiration endogène minimum ($QO_2 \simeq 2$ ml). Si la totalité de l'oxygène utilisé par la levure en présence d'aliment exogène est, à tout moment, supérieure à celle qui correspond à l'oxydation théorique du substrat, il est prouvé que le métabolisme endogène persiste et nous pouvons évaluer dans quelle mesure le phénomène se produit.

D'autres méthodes auraient pu être utilisées : Une technique simple en apparence consiste à marquer la levure de façon à obtenir des réserves endogènes radioactives dont la combustion fournit du CO_2 radioactif, facile à différencier du CO_2 provenant de la respiration de substrats exogènes. Mais les travaux relatifs à ce sujet font apparaître les difficultés d'obtenir une levure possédant des réserves correctement et uniformément marquées. Le marquage obtenu par culture, dans un

milieu contenant du glucose ^{14}C, nécessite l'emploi d'une énorme quantité de ce substrat. D'autre part, on risque d'obtenir des réserves insuffisamment marquées en faisant assimiler préalablement à la levure du glucose radioactif. Blumenthal (1954), Dawes et Ribbons (1962), attirent l'attention sur les difficultés inhérentes à l'emploi de cette dernière méthode, et sur la prudence qu'il faut observer quant à l'interprétation des résultats obtenus.

Après quelques essais dans nos conditions opératoires, les résultats observés nous semblent suffisamment probants pour ne pas nécessiter l'emploi d'une levure marquée, ou de substrats exogènes radioactifs avec une levure non marquée.

Le substrat est administré en perfusion continue, ce qui permet de suivre l'évolution de la respiration endogène en présence de l'aliment parallèlement à celle d'un témoin identique sans substrat.

Nos expériences sont effectuées avec 3 g de levure sèche en suspension dans 100 ml de solution tamponnée, à la température de 30°. Nous utilisons la méthode du confinement.

III. Respiration endogène en présence d'éthanol (Iscaki, Pottier, 1959).

La vitesse d'infusion de l'éthanol est de l'ordre de celle qui permet une oxydation complète de ce substrat : 0,033 mM /h/g. Théoriquement, l'oxydation de cette quantité d'alcool correspond à un QO_2 de 2,2, proche du QO_2 endogène minimum de la levure (compris entre 1,5 et 2,0).

1° *Résultats :*

Nous avons effectué ces expériences avec huit échantillons différents de levure. Nous présentons une des courbes sur la figure 6 et, sur le tableau I, les valeurs moyennes obtenues.

— Les échanges gazeux de la levure alimentée en éthanol évoluent dans le temps de façon parallèle à ceux de la levure témoin, mais leur valeur est toujours supérieure.

— L'écart moyen trouvé (2,12 ml /h /g) entre les consommations gazeuses de la levure recevant l'éthanol et son témoin sans éthanol, est très voisin de la quantité d'oxygène exigée pour la combustion complète de cet alcool : 2,20 ml /h /g.

Le tableau de chiffres révèle une certaine dispersion attribuable au fait que le taux des réserves endogènes ne peut être exactement au même niveau dans chaque échantillon au début de l'expérience. En

TABLEAU I : *Cinétique du QO_2 pour la levure à l'état d'inanition (QO_2 endogène témoin) et pour la levure recevant de l'*ETHANOL *en perfusion continue à la vitesse de 0,033 m M/h/g de levure sèche.*

Poids de levure sèche utilisée : 3 g.

Ces résultats représentent la moyenne de 8 expériences.

Temps moyen (heures)	QO_2 trouvé avec l'ETHANOL (1)	QO_2 endogène témoin (2)	QO_2 attribuable à l'ETHANOL seul (1) — (2)
0 h 45	8,10 ± 0,80	6,02 ± 0,80	2,08 ± 0,15
2 h 45	5,08 ± 0,22	2,76 ± 0,28	2,32 ± 0,16
4 h 45	3,80 ± 0,12	1,60 ± 0,17	2,20 ± 0,09
7 h 00	3,44 ± 0,14	1,56 ± 0,17	1,88 ± 0,18

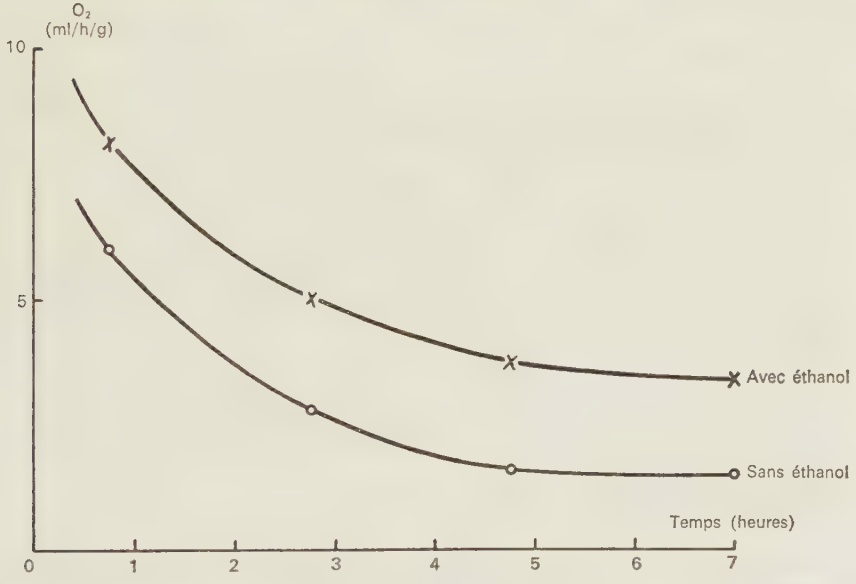


Figure 6 : *Évolution comparée du QO_2 en fonction du temps, pour une levure recevant de l'éthanol en perfusion continue et pour une levure à l'état d'inanition (QO_2 endogène témoin).*
Vitesse d'administration de l'éthanol : 0,033 m M/h/g sec
Poids de levure utilisée : 3 g (poids sec)
Température : 30°.

dépit de cela, l'écart entre la consommation d'oxygène de chaque échantillon de levure avec et sans alcool est assez constant. Le quotient respiratoire calculé, correspondant à la différence globale entre les échanges gazeux de la levure alimentée en éthanol et ceux de la levure

témoin est 0,71. Cette valeur ne diffère statistiquement pas de celle du quotient respiratoire théorique de l'éthanol qui est 0,67.

2° *Conclusion :*

Nous pouvons donc affirmer ici : que l'énergie de l'oxydation de l'éthanol ne se substitue pas à celle provenant de l'utilisation des réserves glucidiques endogènes de la levure.

IV. Respiration endogène en présence de glucose. Pottier (1961).

Nous administrons 0,0165 mM de glucose à l'heure par gramme de levure sèche. L'oxydation complète de ce glucose correspondrait à un QO_2 de 2,2, valeur équivalente à celle de l'éthanol précédemment utilisé.

1° *Résultats.*

Les résultats d'une expérience de ce type sont portés sur la figure 7 et nous avons exprimé les moyennes obtenues sur le tableau II.

— Les échanges respiratoires en présence de glucose sont plus élevés que ceux de la levure témoin ne recevant pas de substrat.

— Le surplus d'oxygène consommé est inférieur à celui qu'aurait nécessité la combustion totale du glucose administré. Néanmoins le sucre est complètement métabolisé par la levure car nous n'en retrouvons jamais à l'état libre dans le milieu.

Tableau II : *Cinétique du QO_2 pour la levure à l'état d'inanition (QO_2 endogène témoin) et pour la levure recevant du* glucose *en perfusion continue à la vitesse de 0,0165 m M/h/g de levure sèche.*

Poids de levure sèche utilisée : 3 g.

Ces résultats représentent la moyenne de 12 expériences.

Temps moyen (heures)	QO_2 trouvé avec le glucose (1)	QO_2 endogène témoin (2)	QO_2 attribuable au glucose seul (1) — (2)
0 h 15	13,12 ± 0,58	12,23 ± 0,56	0,88 ± 0,18
0 h 45	7,59 ± 0,88	6,70 ± 0,88	0,89 ± 0,13
2 h 45	4,01 ± 0,27	3,12 ± 0,32	0,89 ± 0,13
4 h 45	2,76 ± 0,14	1,53 ± 0,18	1,23 ± 0,12
6 h 50	2,73 ± 0,19	1,50 ± 0,13	1,23 ± 0,14

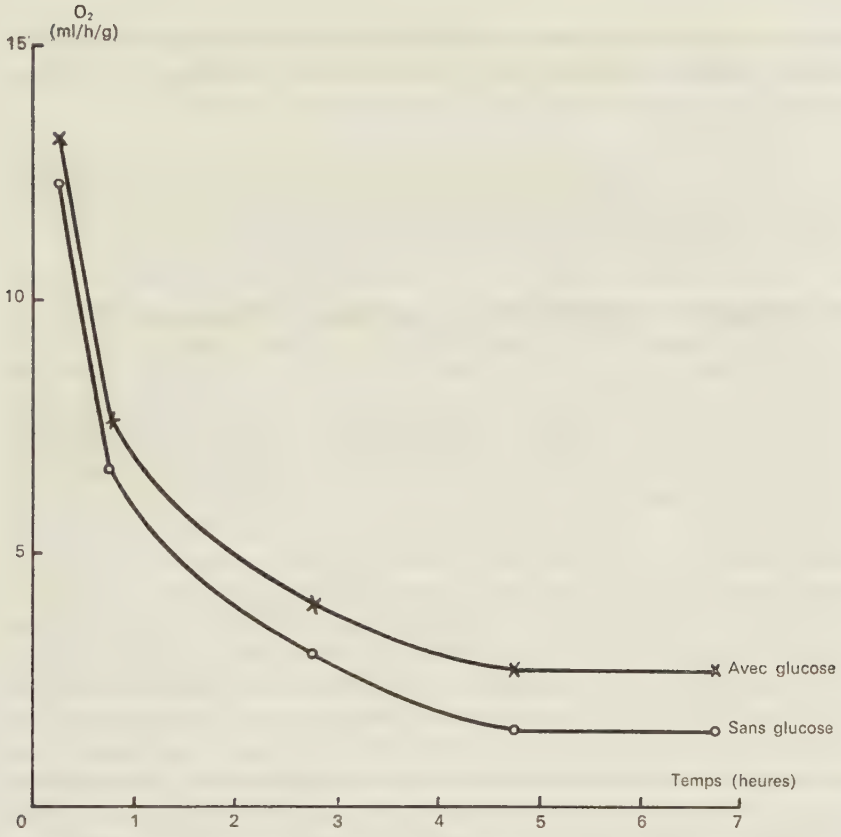


Figure 7 : *Évolution comparée du QO_2 en fonction du temps, pour une levure recevant du glucose en perfusion continue et pour une levure à l'état d'inanition (QO_2 endogène témoin).*
Vitesse d'administration du glucose : 0,0165 m M/h/g sec
Poids de levure utilisée : 3 g (poids sec)
Température : 30° C.

— L'examen des courbes fait apparaître l'existence de 2 phases successives :

1) Pendant les 4 premières heures de l'expérience, où l'intensité de la respiration endogène subit une baisse rapide, le QO_2 attribuable à l'oxydation du glucose (différence entre QO_2 total et QO_2 endogène) est 0,89; le rapport d'oxydation de ce sucre est égal à 0,89 /2,2 soit 0,40.

2) Ensuite lorsque le métabolisme endogène baisse plus lentement (entre 4 et 7 heures), l'augmentation du QO_2 devient égale à 1,23 et le rapport d'oxydation, 1,23 /2,2 est égal à 0,56. Ce dernier chiffre est supérieur à celui que l'on trouve généralement pour de plus fortes administrations glucosées. Cependant une oxydation complète du glucose n'est jamais observée.

— Le quotient respiratoire est égal à 1,0. Il est identique à celui de la respiration endogène et il s'en suit que son examen n'apporte aucune indication quant à l'interprétation des résultats.

2° *Conclusion.*

Les faits observés sont plus difficiles à interpréter avec le glucose qu'avec l'éthanol. Il demeure cependant évident que la consommation du glucose ne supprime pas totalement la respiration endogène.

Le QO_2 total trouvé est toujours supérieur à 2,2 (QO_2 correspondant à une oxydation complète du sucre ajouté). Il s'étage entre 12,2 pour le première mesure et 2,73 pour la dernière. Nous avons constaté entre 4 et 7 heures une apparente augmentation du rapport d'oxydation du glucose : 0,56 au lieu de 0,40. Ceci peut s'expliquer de la façon suivante : la fraction du sucre qui échappe à l'oxydation complète en début d'expérience, sert à former de nouvelles réserves, et celles-ci deviennent un substrat endogène potentiel qui peut relever le niveau de la respiration endogène par la suite. Blumenthal (1954) attire l'attention sur ce phénomène. Il est donc possible de penser qu'à tout moment le glucose est partiellement oxydé dans les mêmes proportions. S'il en est ainsi, il demeure net que la partie complètement oxydée du glucose s'ajoute au métabolisme des réserves endogènes. Nous pouvons donc conclure que le glucose ne se substitue pas aux métabolites endogènes glucidiques.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de différents auteurs : Winzler (1940), Reiner et coll. (1949). La plupart des auteurs ont constaté la persistance des oxydations endogènes pendant la respiration exogène chez différents microorganismes. Leur conclusion est que la respiration endogène persiste pendant l'oxydation du glucose et de l'acétate, chez les microorganismes cultivés sur un milieu glucidique.

V. Conclusions :

Il apparaît que l'énergie de l'oxydation de l'éthanol ou du glucose ne se substitue pas à celle provenant de l'oxydation des métabolites glucidiques de réserve de la levure.

Lorsque nous considérons uniquement la respiration exogène de quantités d'éthanol ou de glucose peu élevées, il convient donc de soustraire les échanges endogènes des échanges gazeux totaux.

Quand les quantités de glucose et d'éthanol administrées sont élevées, bien que nous n'ayons pas la preuve directe de la persistance de la respiration endogène, nous défalquons également celle-ci. A ce moment, les échanges gazeux totaux sont très grands par rapport aux échanges endogènes (20 à 40 fois plus élevés). Aussi, même si nous défalquons dans ce cas de manière abusive la respiration endogène, ceci ne modifiera pas l'interprétation de nos résultats ultérieurs.

CHAPITRE III

RESPIRATION EN PRÉSENCE D'UN MÉLANGE DE GLUCOSE ET D'ÉTHANOL EXOGÈNES

L'objet de ce travail est de chercher à savoir si l'éthanol reste un aliment énergétique pour la levure lorsque celle-ci consomme simultanément du glucose exogène. Dans l'affirmative, nous voulons déterminer dans quelles proportions la levure peut utiliser cet alcool en présence de glucose.

Nous nous attachons ici à comparer les résultats obtenus en fournissant à la levure comme substrats : soit du glucose seul, soit de l'éthanol seul, soit un mélange glucose-éthanol dans des conditions expérimentales bien déterminées et rigoureusement identiques.

Nos substrats sont administrés en perfusion régulière et continue pendant toute la durée de l'expérience. La souplesse de cette méthode d'administration, comme nous l'avons vu plus haut, permet d'obtenir des intensités respiratoires différentes en fonction de la vitesse d'infusion de ces substrats. Nous pouvons ainsi nous placer dans les conditions qui entraînent des échanges gazeux de valeurs s'étageant entre celle de la respiration endogène et celle de la respiration maximale.

Dans un premier temps, nous administrons des substrats non radioactifs et nous examinons dans chacun des cas :

— la consommation d'oxygène et le dégagement de gaz carbonique.

— le quotient respiratoire.

— les quantités de substrats utilisées et leurs coefficients d'oxydation respectifs,

— l'aspect quantitatif du matériel de réserves formé et accumulé par la levure.

Ensuite, pour compléter cette étude, la levure reçoit un mélange de glucose non radioactif et d'éthanol marqué au ^{14}C.

I. Administration de glucose et d'éthanol non radioactifs.

A. Conditions expérimentales.

Les expériences sont effectuées selon la méthode du confinement à la température de 30°. Les 250 mg de levure fraîche utilisés, soit 74 mg de levure sèche, sont mis en suspension dans 100 ml. de tampon et

introduits dans des ballons hermétiquement clos dont le volume varie de 1 à 3 litres. Les substrats sont administrés en perfusion continue à des vitesses s'échelonnant entre 0,50 et 6,6 mM par heure par g. de levure sèche. Le temps d'expérimentation est de 6 heures de façon à obtenir, avec les plus faibles quantités de substrats infusées, des échanges gazeux totaux suffisamment élevés pour diminuer les erreurs relatives. A des fins de comparaison, ce temps est le même pour toutes les expériences. Nous calculons les QO_2, QCO_2 et les Q.R. globaux.

Le dosage des substrats restant éventuellement dans le milieu et l'évaluation du poids sec de la levure, sont réalisés à la fin de chaque expérience.

Chaque résultat transcrit sur les tableaux et les figures représente la moyenne de 8 expériences effectuées sur des échantillons différents de levure. Rappelons que nous défalquons de tous nos chiffres, la valeur des échanges endogènes témoins.

B. Résultats.

1° *Examen des échanges respiratoires et des quantités de substrats utilisées.*

a) *Avec le glucose seul.*

Les résultats sont portés sur le tableau III :

— Le niveau des échanges gazeux est proportionnel à la vitesse d'administration des substrats. Il faut que celle-ci atteigne 3,3 mM/h/g pour que la consommation d'oxygène s'établisse à une valeur maximale ($QO_2 = 93,3$) qui n'est pas dépassée avec des infusions de plus grandes quantités de sucre.

— Le quotient respiratoire est toujours très voisin de 1,0.

— Les quantités de glucose utilisées par la levure pendant les 6 heures d'expérience sont également proportionnelles à la vitesse d'administration. Nous les avons consignées sur le tableau IV.

Cependant, nous constatons qu'il reste du sucre dans le milieu en fin d'expérience, et d'autant plus que le concentration de la solution infusée est plus élevée. Lorsque la vitesse d'administration du glucose est égale à 3,3 mM/h/g, celui-ci s'accumule notablement dans le milieu, la concentration finale retrouvée est de l'ordre de 1,2 p. mille. Nous avons déterminé plus haut que la fermentation aérobie peut commencer à apparaître, quand la concentration du glucose dans le milieu avoisine 1 p. mille, nous devons donc nous demander s'il y a ici fermentation.

Notons d'abord que l'accumulation du sucre est progressive, ce n'est que vers la fin de l'expérience, au bout de 6 heures,que celle-ci

TABLEAU III : *Échanges et quotients respiratoires en fonction de la vitesse d'administration du* GLUCOSE.

Poids de levure sèche utilisée : 74 mg. Durée des expériences : 6 heures.

Ces résultats représentent la moyenne de 8 expériences.

Vitesse d'administration du GLUCOSE m M/h/g	O_2 total consommé m M	QO_2	CO_2 total dégagé mM	QCO_2	Q.R.
0,50	0,394 ± 0,020	19,95 ± 1,02	0,400 ± 0,016	20,22 ± 0,86	1,015 ± 0,025
1,00	0,842 ± 0,025	42,60 ± 1,29	0,858 ± 0,025	43,40 ± 1,29	1,018 ± 0,017
1,65	1,281 ± 0,045	64,90 ± 2,26	1,312 ± 0,041	66,50 ± 2,06	1,025 ± 0,014
3,30	1,840 ± 0,058	93,30 ± 2,94	1,920 ± 0,076	97,30 ± 3,84	1,040 ± 0,023
6,60	1,790 ± 0,090	90,50 ± 4,52	1,940 ± 0,094	98,00 ± 4,75	1,080 ± 0,031

TABLEAU IV : *Quantités de* GLUCOSE *disparues et calcul du rapport d'oxydation en fonction de la vitesse d'administration.*

Poids de levure sèche utilisée : 74 mg. Durée des expériences : 6 heures.

GLUCOSE administré			GLUCOSE restant		GLUCOSE disparu		Calcul du RAPPORT D'OXYDATION		
Vitesse d'administration	Quantité totale						Oxygène consommé	GLUCOSE disparu exprimé en	Valeur du rapport
m M/h/g	mg	mM	mg	conc.°/oo	mg	mM	mM (1)	mM d'oxygène (2)	(1)/(2)
0,50	40	0,222	3,9	0,039	36,1	0,201	0,394	1,206	0,33
1,00	80	0,444	9,8	0,098	70,2	0,390	0,842	2,340	0,36
1,65	132	0,735	27,2	0,272	104,8	0,582	1,281	3,495	0,37
3,30	264	1,470	118,0	1,180	146,0	0,812	1,840	4,870	0,38
6,60	528	2,940	348,0	3,480	180,0	1,000	1,860	6,000	0,31

dépasse 1 mg. de glucose par ml. Pendant toute la durée de l'infusion du glucose à cette vitesse de 3,3 mM/h/g, nous avons surveillé la valeur du Q. R. et constaté qu'elle n'augmente pas en fin d'expérience; nous n'avons d'ailleurs pas retrouvé d'éthanol libre dans le milieu.

D'autre part, nous avons effectué quelques expériences du type suivant : Une suspension de levure ayant reçu du glucose pendant 6 heures à la vitesse de 3,3 mM/h/g est lavée par centrifugation et remise dans du tampon. Une suspension équivalente de levure fraîche est préparée et ces deux échantillons sont mis en présence d'une quantité globale de glucose déterminant d'emblée la fermentation. Or, nous avons constaté que l'intensité de la fermentation est plus faible avec les cellules ayant déjà reçu le glucose. Il semblerait donc que l'« Effet Pasteur » pourrait être légèrement augmenté par une adaptation progressive à l'assimilation du glucose. Ce fait expliquerait le non-fermentation de la levure, en fin d'expérience, quand la concentration du sucre est un peu supérieure à 1 pour mille.

Lorsque la vitesse d'administration du glucose dépasse 3,3 mM/h/g, l'accumulation de ce sucre dans le milieu va en s'accroissant et la fermentation risque peu à peu de s'installer. Aussi, dans les expériences où nous mélangeons éthanol et glucose, cette vitesse n'est pas dépassée pour le glucose.

Rappelons que nous nous sommes efforcés de travailler dans des conditions physiologiques normales, sans employer d'inhibiteurs de fermentation; de ce fait, les difficultés d'expérimentation sont accrues.

Le seul facteur, permettant ici d'éviter la fermentation, est de limiter la concentration du glucose dans le milieu de suspension de la levure. Nous voyons que cette condition paraît remplie ici d'une façon acceptable.

— En dernier lieu, nous avons calculé les rapports d'oxydation du glucose, puisque nous connaissons d'une part la consommation d'oxygène et d'autre part, la quantité de sucre utilisée par la levure dans chaque expérience. Nous remarquons que ce rapport est assez constant (de 0,33 à 0,38) et indépendant de la vitesse d'administration du substrat lorsque celle-ci est comprise entre 0,50 et 3,3 mM/h/g (cf. tableau IV).

b) *Avec l'éthanol seul.*

Les résultats sont portés sur le tableau V :

— Le niveau des échanges respiratoires est proportionnel à la vitesse d'administration de l'éthanol. Nous obtenons un QO_2 maximum de 93, quand nous atteignons la vitesse de 3,3 mM/h/g.

— Le quotient respiratoire est inférieur à 0,67 et d'autant plus bas

TABLEAU V : *Échanges et quotients respiratoires en fonction de la vitesse d'administration de l'*ETHANOL.

Poids de levure sèche utilisée : 74 mg. Durée des expériences : 6 heures.
Ces résultats représentent la moyenne de 8 expériences.

Vitesse d'administration de l'ETHANOL m M/h/g	O_2 total consommé mM	QO_2	CO_2 total dégagé mM	QCO_2	Q.R.
0,50	0,433 ± 0,015	21,92 ± 0,79	0,230 ± 0,007	11,63 ± 0,34	0,53 ± 0,016
1,00	0,838 ± 0,029	42,40 ± 1,49	0,420 ± 0,010	21,20 ± 0,52	0,50 ± 0,013
1,65	1,215 ± 0,029	61,50 ± 1,47	0,563 ± 0,022	28,50 ± 1,11	0,46 ± 0,014
3,30	1,838 ± 0,071	93,00 ± 3,62	0,552 ± 0,024	27,95 ± 1,20	0,30 ± 0,018
6,60	1,860 ± 0,080	94,00 ± 4,07	0,576 ± 0,012	29,20 ± 0,59	0,31 ± 0,014

que la quantité d'alcool infusée est grande. Cependant, nous observons que le QO_2 et le QCO_2 n'évoluent pas parallèlement, le QCO_2 se stabilise à un niveau constant alors que le QO_2 continue à augmenter. Nous reviendrons sur cette question.

— La quantité d'éthanol utilisée, portée sur le tableau VI, est proportionnelle à la vitesse d'administration. Jusqu'à 3,3 mM/h/g, l'alcool infusé disparaît presque totalement du milieu, ce n'est que pour des vitesses d'administration supérieures que l'éthanol commence à s'accumuler notablement dans le milieu.

— Le rapport d'oxydation est toujours inférieur à l'unité et décroît régulièrement quand la quantité de substrat augmente.

Donc nous n'obtenons jamais ici une oxydation complète de l'éthanol utilisé, comme en témoignent le Q.R. et le coefficient d'oxydation. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec ceux du chapitre I.

Étude détaillée du quotient respiratoire en fonction de la vitesse d'administration :

La diminution progressive du Q.R. résulte du fait que lorsque la quantité d'éthanol administrée s'élève, la consommation d'oxygène s'accroît plus vite que le dégagement de gaz carbonique (cf. tableau V). De plus, lorsque la vitesse d'administration atteint environ 1,65 mM/h/g l'élimination du CO_2 se stabilise à un niveau fixe : $QCO_2 \simeq 28$, alors que l'oxygène utilisé continue à augmenter jusqu'à la vitesse d'infusion de 3,3 mM/h/g. Tout se passe donc comme si deux systèmes de réactions régissaient le métabolisme de l'éthanol : Nous avons, d'une part des décarboxylations oxydatives et, d'autre part un système d'oxydation non accompagné de décarboxylation.

Ce deuxième système d'oxydation doit faire apparaître un produit intermédiaire dont le Q.R. de formation est zéro, et qui ne se trouve pas totalement oxydé tant que dure la perfusion de l'éthanol dans le milieu. Néanmoins, après cessation de l'administration de l'alcool, nous avons observé que ce produit accumulé est oxydé avec un quotient respiratoire égal à l'unité.

Il s'agit vraisemblablement d'acétate puisque les quotients respiratoires de formation et de combustion de ce corps correspondent à ceux de l'acétate. Nous avons donc effectué l'identification et le dosage de l'acide acétique.

Identification et dosage de l'acide acétique formé.

Nous avons recherché ce produit en appliquant la méthode de Prévot décrite dans le chapitre des techniques.

TABLEAU VI : *Quantités d'*ETHANOL *disparues et calcul du rapport d'oxydation en fonction de la vitesse d'administration.*

Poids de levure sèche utilisée : 74 mg. Durée des expériences : 6 heures.

ETHANOL administré		ETHANOL restant	ETHANOL disparu	Calcul du RAPPORT D'OXYDATION		
Vitesse d'administration mM/h/g	Quantité totale mM	mM	mM	Oxygène consommé mM (1)	ETHANOL disparu exprimé en mM d'oxygène (2)	Valeur du rapport (1)/(2)
0,50	0,222	0,005	0,217	0,433	0,651	0,665
1,00	0,444	0,008	0,436	0,838	1,308	0,640
1,65	0,735	0,019	0,716	1,215	2,148	0,565
3,30	1,470	0,100	1,370	1,838	4,110	0,450
6,60	2,940	1,540	1,400	1,860	4,200	0,445

Cette identification et ce dosage sont faits en fin d'expérience quand l'éthanol a été administré à des vitesses comprises entre 1,00 et 3,30 mM/h/g. Le milieu de suspension de la levure acidifié à l'aide d'acide tartrique est soumis à un entraînement à la vapeur. L'acidité volatile totale est dosée avec de l'hydroxyde de sodium N/10. Une partie aliquote de la solution obtenue (110 ml.) subit une distillation fractionnée, chaque fraction de 10 ml. de distillat est titrée par de la baryte. Nous portons sur le tableau VII, les chiffres représentant le pourcentage de baryte utilisée, pour chaque fraction de 10 ml. de distillat, par rapport à la quantité totale d'eau de baryte utilisée.

TABLEAU VII : *Nature des produits intermédiaires formés lors d'administration d'éthanol à une vitesse supérieure à 1 m M/h/g.*

Chacun des chiffres présentés est obtenu en multipliant le volume d'eau de chaux nécessaire à la neutralisation de la prise par le coefficient obtenu en divisant 100 par la totalité de l'eau de chaux employée pour neutraliser les 100 ml de distillat.

Volume de distillat ml	Témoin Acide acétique pur	Témoin Acide Acétique + Acide Propionique $\frac{P}{A} = \frac{1}{20}$	Résultats expérimentaux
10	7,4	7,6	7,5
20	15,2	15,6	15,7
30	23,4	23,9	24,0
40	32,0	32,2	32,3
50	40,9	41,6	41,7
60	51,0	51,2	51,0
70	60,8	61,3	61,4
80	72,0	72,5	72,2
90	85,5	84,4	85,5
100	100,0	100,0	100,0

Ces chiffres vont nous permettre d'identifier notre acide. En effet, chaque acide volatil ou mélange de deux acides volatils, traité de cette manière donne des résultats déterminés, caractéristiques de ou des acides étudiés. Nous comparons donc sur le tableau VII nos propres résultats aux chiffres donnés par les tables de Prévot (précisons que dans nos conditions expérimentales, nous sommes tombés sur des chiffres en parfait accord avec les dites tables, pour un témoin avec de l'acide acétique pur).

Nous voyons que la substance retrouvée dans le milieu est bien de l'*acide acétique*, avec environ 5 p. cent d'acide propionique.

Nous portons sur le tableau VIII les quantités d'acide acétique retrouvées dans le milieu, en fonction de la vitesse d'administration de l'éthanol. Nous pouvons donc conclure que : dès que l'éthanol est administré à des vitesses pour lesquelles l'élimination du gaz carbonique se stabilise, il y a apparition dans le milieu d'acide acétique en excès qui s'accumule.

TABLEAU VIII : *Quantités d'acide acétique retrouvées en fonction de la vitesse d'administration de l'éthanol seul.*

Poids de levure sèche utilisée : 74 mg. Durée des expériences : 6 heures.

Vitesse d'administration de l'ETHANOL mM/h/g	ACIDE ACÉTIQUE accumulé dans le milieu mM	QCO_2
0,50	traces	11,65
1.00	traces	21,20
2,00	0,22	28,50
2,50	0,49	27,95
3,30	0,76	27,90

c) *Avec le mélange éthanol-glucose.*

Nous connaissons les échanges respiratoires de la levure alimentée soit en éthanol, soit en glucose, dans des conditions rigoureusement identiques. Nous administrons maintenant ces deux substrats simultanément. Le mélange du glucose et de l'éthanol infusé sera d'abord équimoléculaire, c'est-à-dire que la levure recevra :

0,50 m M/h/g de glucose + 0,50 m M/h/g d'éthanol soit au total 1,00m M/h/g de substrat
1,00 » + 1,00 » « 2,00 »
1,65 » + 1,65 » » 3,30 »
3,30 » + 3,30 » » 6,60 »

Ensuite, en maintenant au total une même vitesse d'administration, nous faisons varier, au sein du mélange, le rapport moléculaire entre l'éthanol et le glucose.

1. *Éthanol et glucose administrés dans un rapport équimoléculaire.*

Les résultats sont consignés sur le tableau IX.

— Nous voyons que la consommation d'oxygène est fonction de la vitesse d'administration des substrats.

— Le quotient respiratoire a une valeur fixe (environ 0,83) indépendante de la quantité d'aliments infusée.

TABLEAU IX. : *Échanges et quotients respiratoires en fonction de la vitesse d'administration du mélange* GLUCOSE-ETHANOL,

Poids de levure sèche utilisée : 74 mg. Durée des expériences : 6 heures.

Ces résultats représentent la moyenne de 8 expériences.

Vitesse d'administration GLUCOSE + ETHANOL m M/h/g	O_2 total consommé mM	QO_2	CO_2 total dégagé mM	QCO_2	Q.R.
0,50 + 0,50	0,705 ± 0,022	35,70 ± 1,13	0,590 ± 0,016	29,80 ± 0,81	0,835 ± 0,019
1,00 + 1,00	1,425 ± 0,039	72,20 ± 1,97	1,160 ± 0,040	58,80 ± 2,04	0,815 ± 0,022
1,65 + 1,65	1,855 ± 0,071	94,00 ± 3,62	1,500 ± 0,062	76,00 ± 3,17	0,810 ± 0,013
3,30 + 3,30	1,990 ± 0,067	100,50 ± 3,40	1,710 ± 0,076	86,50 ± 3,85	0,860 ± 0,022

TABLEAU X : *Étude comparative des quantités de glucose et d'éthanol consommées, en fonction de la vitesse d'administration, lorsque ces substrats sont administrés séparément ou en mélange.*

Poids de levure sèche utilisée : 74 mg. Durée des expériences : 6 heures. Ces résultats représentent la moyenne de 8 expériences.

Substrats administrés					Substrats utilisés			
Vitesse d'administration m M/h/g			Quantités administrées m M		Quantités totales mM			
Cas	GLUCOSE	ETHANOL	GLUCOSE	ETHANOL	Cas I GLUCOSE seul	Cas II ETHANOL seul	Cas III : GLUCOSE + ETHANOL (en GLUCOSE)	Cas III : GLUCOSE + ETHANOL (en ETHANOL)
I	0,50	0	0,222	0	0,201 ± 0,003	0,217 ± 0,003	0,200 ± 0,003	0,214 ± 0,003
II	0	0,50	0	0,222				
III	0,50	0,50	0,222	0,222				
I	1,00	0	0,444	0	0,390 ± 0,006	0,436 ± 0,003	0,360 ± 0,010	0,430 ± 0,009
II	0	1,00	0	0,444				
III	1,00	1,00	0,444	0,444				
I	1,65	0	0,735	0	0,582 ± 0,013	0,716 ± 0,006	0,547 ± 0,022	0,574 ± 0,010
II	0	1,65	0	0,735				
III	1,65	1,65	0,735	0,735				
I	3,30	0	1,470	0	0,812 ± 0,031	1,370 ± 0,034	0,770 ± 0,034	0,580 ± 0,037
II	0	3,30	0	1,470				
III	3,30	3,30	1,470	1,470				

— Les quantités de substrat consommées figurent dans le tableau X Dès que la vitesse d'administration du mélange atteint 1,65 mM/h/g, moins d'éthanol est utilisé, tandis que la quantité de glucose consommée reste la même que pour le témoin sans éthanol.

2. *Éthanol et glucose administrés dans un rapport moléculaire variable.*

Nous avons choisi comme vitesse d'administration totale des substrats : 3,3 mM/h/g et porté sur la figure 8 les quotients respiratoires obtenus pour les mélanges effectués à différents rapports.

Nous voyons que le Q.R. est fonction des proportions respectives des deux substrats contenus dans le mélange. C'est-à-dire que plus la quantité relative d'éthanol est grande, plus le Q.R. est bas. Par conséquent, glucose et éthanol sont toujours simultanément utilisés, au prorata de leurs proportions relatives dans le mélange administré.

En dosant l'éthanol résiduel du milieu, nous constatons aussi qu'il y a toujours moins de cet alcool utilisé en présence de glucose que lorsqu'il est administré seul.

2° *Examen des réserves formées.*

Qu'il s'agisse d'éthanol ou de glucose, une certaine partie de la quantité de substrat métabolisée par la levure est accumulée dans les cellules sous des formes qui échappent à la combustion rapide. En fin d'expérience, le poids sec de la levure a augmenté. En ce qui concerne notre travail, nous n'avons étudié les réserves formées que sous leur aspect quantitatif. Cependant, il nous semble intéressant de mentionner quelques travaux effectués par différents auteurs, sur la nature des produits de synthèse accumulés dans la levure, lors de l'utilisation aérobie du glucose et de l'éthanol.

a) *Aspect qualitatif.*

Les principales réserves formées à partir du glucose sont le glycogène et le tréhalose. Une revue approfondie de cette question a été faite par Trevelyan (1958). C'est particulièrement en aérobiose qu'une forte proportion de glucose est retenue par les cellules : Winzler et Baumberger (1938), Clifton (1946).

Le tréhalose libre s'accumule dans la levure lorsqu'elle se trouve dans des conditions de non-prolifération : Trevelyan et Harrison (1956), Panek (1959). Lorsque la levure est alimentée en éthanol, il se forme également du glycogène ainsi que le démontrent Smedley-Maclean et Hoffert (1926). D'après Brucke (1933), on trouve deux fois moins de glycogène à partir de l'éthanol qu'avec une quantité

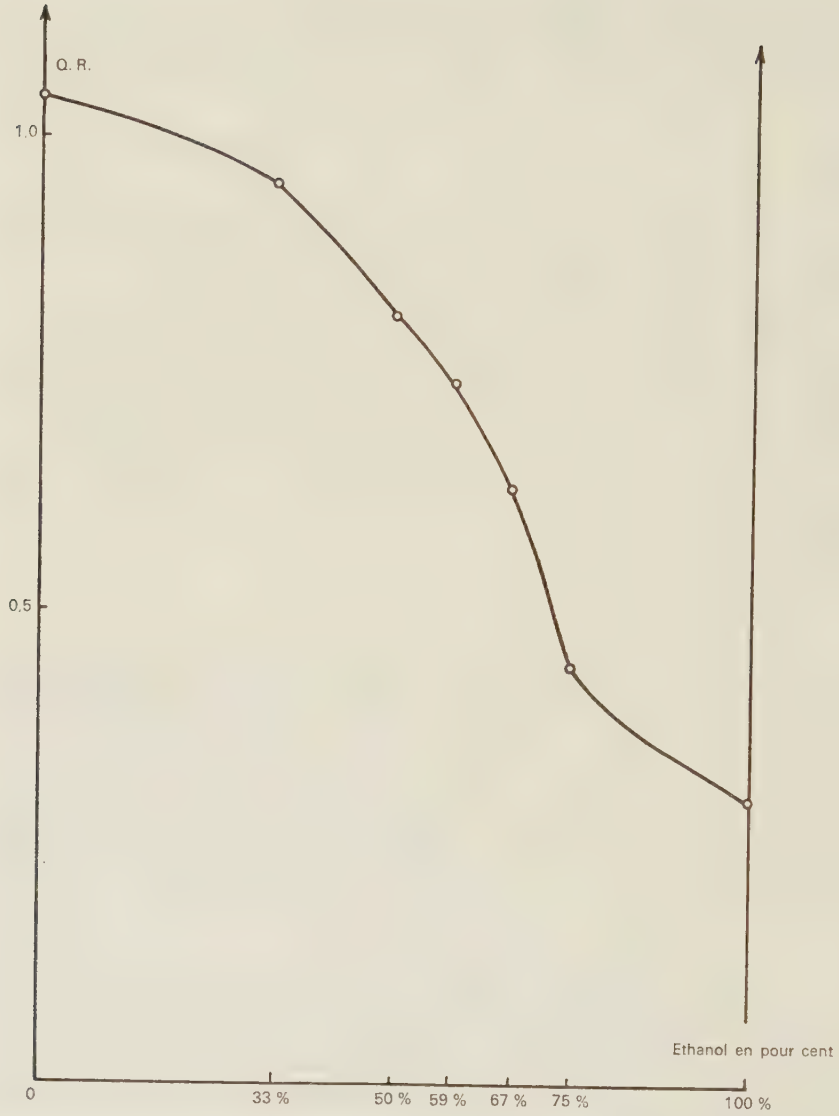


Figure 8 : *Évolution du Q.R. en fonction du pourcentage d'éthanol contenu dans le mélange éthanol-glucose.*

Les substrats sont administrés en perfusion continue à une vitesse totale toujours égale à 3,3 m M/h/g sec.

TABLEAU XI : *Augmentation de poids sec de la levure, en fonction de la nature et de la vitesse d'administration des substrats.*

Poids de levure sèche utilisée : 74 mg. Durée des expériences : 6 heures.
Ces résultats représentent la moyenne de 8 expériences.

Vitesse d'administration des substrats mM/h/g			Augmentation de poids sec de la levure mg		
Glucose	Ethanol	Glucose + Ethanol	Avec glucose seul	Avec éthanol seul	Avec glucose + éthanol
0,50	0,50	0,50 + 0.50	23,85 ± 1,10	4,90 ± 1,17	28,15 ± 1,43
1,00	1,00	1,00 + 1,00	30,55 ± 1,63	9,20 ± 1,36	35,85 ± 1,48
1,65	1,65	1,65 + 1,65	36,05 ± 1,44	14,55 ± 1,00	37,50 ± 1,35
3,30	3,30	3,30 + 3,30	37,40 ± 1,14	15,60 ± 1,38	38,30 ± 1,05

équivalente de glucose. En 1955, Aubert et Milhaud ont étudié le mécanisme de formation du tréhalose à partir de l'éthanol marqué sur le $^{14}C_2$. Leurs résultats mettent en évidence la réversibilité de la glycolyse.

De plus, ces mêmes auteurs Milhaud et Aubert (1955), Aubert et Milhaud (1956), comparent les différents produits intermédiaires qui apparaissent au cours du métabolisme soit du glucose, soit de l'éthanol :

Les produits formés sont les mêmes dans les deux cas, ce ne sont que leurs quantités relatives qui diffèrent. A partir de l'alcool, il y a davantage de produits dérivant du cycle tricarboxylique.

En présence d'air, il se forme également des lipides à partir du glucose, de l'éthanol ou de l'acétate exogènes, ainsi que le constatent Smedley-Maclean et Hoffert (1923), Kleinzetler (1948) puis Klein (1955).

b) *Aspect quantitatif.*

Nous avons déterminé le poids sec avant et après l'administration des substrats. La suspension est centrifugée, le culot est lavé deux fois à l'eau glacée, puis séché à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant. Nous calculons les augmentations de poids sec après l'administration de glucose seul, d'éthanol seul et du mélange alcool-glucose. Ces valeurs sont comparées sur le tableau XI. Le poids des réserves formées est plus important avec le glucose qu'avec l'éthanol. Nous nous attendions à ce résultat car le rapport d'oxydation de l'éthanol est plus grand que celui du glucose. Il y a additivité partielle des réserves retrouvées pour le mélange éthanol-glucose aux faibles vitesses d'administration, tandis que le mélange à 3,3 mM/h/g de chaque substrat, ne donne pas un poids sec supérieur à celui obtenu avec le glucose seul, pour une vitesse d'administration équivalente.

C. Discussion des résultats.

Comparaison des résultats obtenus avec éthanol seul, glucose seul et mélange éthanol-glucose.

1° QO_2.

Nous avons porté sur une courbe commune : figure 9, les valeurs de ce paramètre obtenues avec le glucose seul, l'éthanol seul et le mélange des deux substrats en fonction de la vitesse d'administration.

a) Nous obtenons, avec l'éthanol seul et le glucose seul, des consommations d'oxygène de valeurs égales quand leurs vitesses d'administration, exprimées en mM, sont les mêmes. Ce résultat serait impossible,

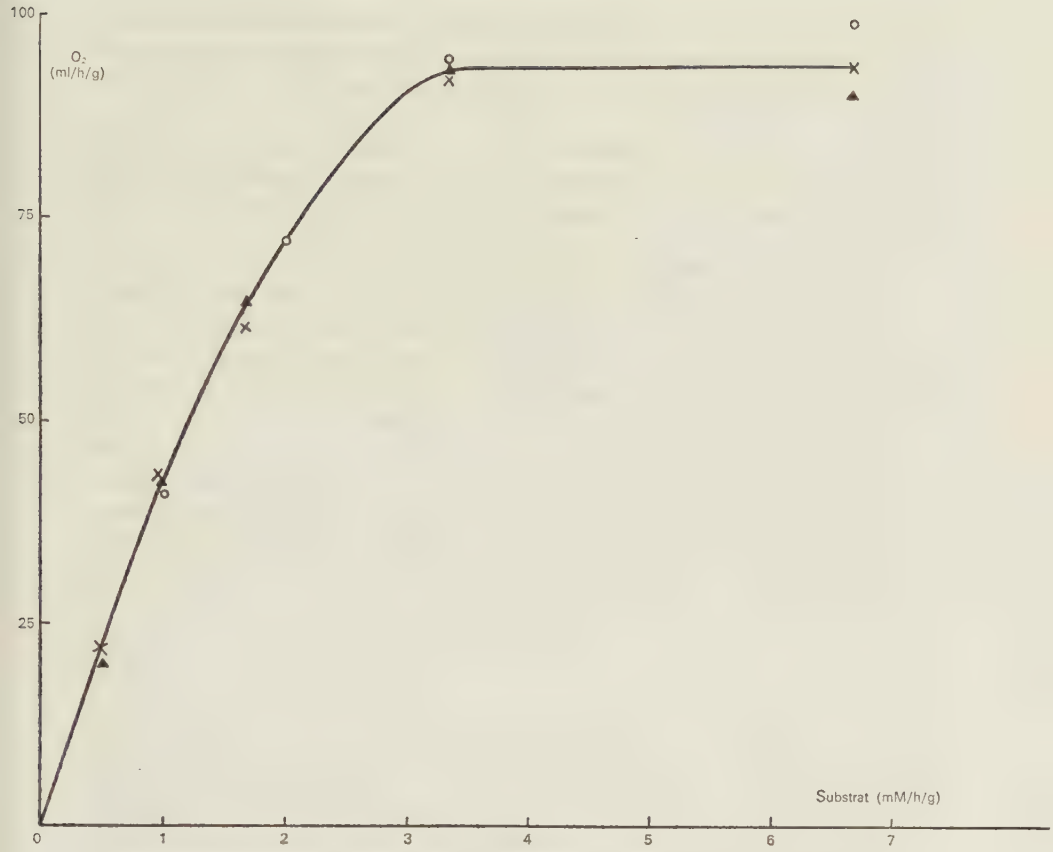


Figure 9 : *Évolution du QO_2 en fonction de la vitesse d'administration des substrats.*
— Glucose seul : Δ
— Éthanol seul : ×
— Mélange éthanol-glucose (dont 50 % d'éthanol) : O

si la levure oxydait complètement, en CO_2 et H_2O, le glucose et l'éthanol qu'elle reçoit.

En effet, une molécule de glucose exige 6 molécules d'oxygène pour son oxydation totale, alors qu'une molécule d'éthanol n'en consomme que 3 seulement, soit la moitié. Mais il se trouve que :

— d'une part, la quantité de ces deux substrats utilisée par la levure en fonction de la vitesse d'administration n'est pas la même; comme nous le voyons sur le tableau X, il disparaît plus d'éthanol que de glucose du milieu;

— d'autre part, les rapports d'oxydation respectifs de ces substrats sont différents. Alors que pour le glucose, ce rapport est sensible-

ment indépendant de la quantité de glucose assimilée (environ 0,35), il varie pour l'éthanol d'une façon inversement proportionnelle à la quantité consommée (de 0,66 à 0,45 dans ces expériences, cf. tableaux IV et VI).

Par le jeu de ces mécanismes, on voit que l'utilisation de glucose et d'éthanol entraîne la consommation d'une même quantité d'oxygène pour des vitesses d'administration équivalentes en mM/h/g.

b) Lorsque le glucose et l'éthanol sont infusés simultanément dans un rapport équimoléculaire, les QO_2 obtenus se placent sur la courbe précédente (cf. fig. 9). Leurs valeurs correspondent à celles que nous avons trouvées avec le glucose seul et l'éthanol seul, quand la vitesse d'administration de ceux-ci est égale au double de celle de chacun des substrats considérés isolément dans le mélange.

Nous voyons que l'énergie de l'oxydation du sucre s'ajoute à celle de l'alcool tant que le QO_2 maximum n'est pas atteint. Mais lorsque ce QO_2 maximum risque d'être dépassé par le jeu de cette sommation, il n'y a plus addition totale. Le niveau optimum de consommation d'oxygène obtenu avec l'un et l'autre des substrats, n'est pas sensiblement dépassé par l'oxydation du mélange.

2° *Q.R.*

Lorsque glucose et éthanol sont administrés simultanément dans un rapport équimoléculaire, les quotients respiratoires obtenus sont du même ordre de grandeur, soit environ 0,83 quelles que soient les vitesses d'administration des substrats. Ce Q.R. témoigne d'une oxydation simultanée des deux aliments. Il n'est pas étonnant de trouver ce résultat pour les faibles administrations, où il y a une sommation des consommations d'oxygène relatives à l'utilisation, d'une part d'éthanol, d'autre part de glucose. Mais il est intéressant de constater que ce quotient respiratoire est intermédiaire entre celui de l'alcool et du glucose, alors que la levure reçoit à la fois suffisamment de chacun des substrats pour couvrir ses possibilités énergétiques maximales avec l'un d'entre eux.

On voit qu'il n'existe donc pas, du point de vue énergétique, d'aliment préférentiel pour la levure en ce qui concerne le glucose et l'éthanol.

Les expériences réalisées en faisant varier le rapport entre le sucre et l'alcool, au niveau de la respiration maximale, le confirment (cf. fig. 8).

Il y a toujours oxydation simultanée de ces deux substrats, et ceci en relation directe avec la proportion de chacun d'eux contenue dans le mélange.

3° *Quantités d'éthanol utilisées quand ce substrat est administré seul ou en présence de glucose.*

Nous avons observé une diminution de la quantité d'éthanol assimilée par la levure, dans le cas du mélange alcool-glucose, quand les vitesses d'administration deviennent élevées. En conséquence, nous constatons une très forte diminution de la quantité d'acétate formée, retrouvée dans le milieu. Quelques expériences réalisées avec de l'éthanol mélangé au glucose à des vitesses d'administration respectives de 3,3 mM/h/g, font apparaître qu'il y a alors dans le milieu une acidité attribuable à un mélange d'acides en C_2, C_3 et peut-être C_4. Au total cette acidité, exprimée en hydroxyde de sodium N/10, est 3 à 4 fois plus faible qu'avec l'éthanol seul. Bien que notre dosage ici soit difficile à réaliser par la méthode de Prévot, nous constatons que nous retrouvons environ 8 à 10 fois moins d'acide acétique total que lorsque l'alcool est administré seul en quantité équivalente.

La caractérisation des différents acides retrouvés est un point que nous nous proposons d'éclaircir ultérieurement à l'aide d'une méthode de dosage chromatographique.

Cependant, il demeure très net que la réaction de transformation de l'éthanol en acétate libre qui s'accumule dans le milieu est fortement inhibée en présence de glucose.

Notons qu'avec le glucose seul, nous n'avons jamais retrouvé d'acidité dans le milieu en fin d'expérience. Mais il se peut que le métabolisme du glucose soit également modifié par l'effet de la présence de l'éthanol et qu'une certaine partie des acides retrouvés dans le milieu soit, dans ce cas, attribuable au glucose.

4° *Réserves formées.*

Pour le mélange, aux faibles vitesses d'administration, il y a addition partielle des réserves formées avec le glucose seul et avec l'éthanol seul (cf. tableau XI).

A partir d'une perfusion de 1,65 mM/h/g de chaque substrat, les poids secs sont du même ordre de grandeur pour le sucre seul ou le mélange alcool-glucose. Il est impossible, par simple pesée, de savoir dans ce dernier cas, auquel des deux substrats sont attribuables les matières de réserves accumulées dans la levure. De toute manière, une part importante est imputable au glucose, celui-ci fournissant davantage de produits de synthèse que l'alcool. Par ailleurs les travaux de Milhaud et Aubert (1955), ayant pour sujet l'identification des produits formés lorsque l'éthanol et le glucose sont métabolisés ensemble, révèlent que l'alcool ne fournit plus, alors, de métabolites se rattachant à la glycolyse.

Il semble donc que c'est le glucose qui est principalement responsable de la formation des produits de synthèse qui augmentent le poids sec de la levure alimentée avec le mélange des deux substrats.

D. Conclusions

La méthode d'administration employée ici permet la consommation régulière et prolongée de quantités variables de substrats. Cette technique nous a permis de voir :

1° *Avec éthanol et glucose seuls.*

a) La présence d'un QO_2 maximum pour notre souche de levure ($QO_2 \simeq 95$).

b) L'équivalence énergétique molécule à molécule entre le glucose et l'éthanol.

c) Un Q.R. variable inversement proportionnel à la vitesse d'administration pour l'éthanol (de 0,67 à 0,30), tandis que pour le glucose ce Q.R. est fixe et égal à 1,0 environ pour toutes les concentrations étudiées.

d) Pour le glucose, un rapport d'oxydation invariable (de l'ordre de 0,35), tandis que pour l'éthanol ce rapport varie en raison inverse de l'augmentation de la vitesse d'administration (évoluant ici de 0,665 à 0,44).

e) Des consommations complètes de l'éthanol administré jusqu'à la vitesse de perfusion de 3,3 mM/h/g environ; tandis que l'assimilation du glucose s'accompagne toujours d'une accumulation de ce sucre dans le milieu, d'autant plus forte que l'administration est plus rapide.

f) Une formation plus importante de réserves avec le glucose qu'avec l'éthanol pour des vitesses d'administration équivalentes.

g) Dans le cas de l'éthanol, une vitesse d'administration seuil ($\simeq$ 1,50 mM/h/g) à partir de laquelle il s'accumule de l'acide acétique dans le milieu.

2° *Avec le mélange éthanol-glucose.*

a) Les consommations d'oxygène relatives à l'utilisation de chacun des substrats s'ajoutent quand ils sont infusés à faible vitesse; tandis que pour les fortes vitesses administrations, le QO_2 maximum de 95 n'est pas sensiblement dépassé.

b) Un Q.R. intermédiaire pour toutes les vitesses d'administration, laisse prévoir une oxydation simultanée des 2 substrats.

c) Les réserves formées à partir des deux substrats s'ajoutent tant que les vitesses d'infusion sont inférieures à 1,65 mM /h /g, tandis que dans le cas d'administrations à vitesse élevée, le poids de ces réserves ne dépasse jamais le maximum atteint avec le glucose seul.

d) Enfin, sous l'effet de la présence du glucose, la consommation d'éthanol et l'accumulation dans le milieu d'acétate libre diminuent considérablement.

De tout ceci, il résulte clairement que glucose et éthanol sont toujours utilisés concurremment pour la respiration. Lorsque les substrats sont administrés à faibles vitesses, il y a additivité des consommations d'oxygène comme de la formation des matières de réserves. Pour les vitesses d'administration plus importantes, les deux substrats sont également utilisés simultanément, mais, dans ce cas, il n'est pas possible, par cette technique, de connaître les proportions relatives de glucose et d'éthanol métabolisées.

Afin de compléter nos connaissances sur la part prise par l'éthanol, lorsque les deux substrats sont simultanément oxydés par la levure, nous avons estimé nécessaire de suivre, à l'aide d'un traceur radioactif, (éthanol marqué au ^{14}C), le devenir de l'alcool dans les échanges respiratoires totaux, ainsi que dans les produits du métabolisme intermédiaire.

II. Administration d'un mélange de glucose non radioactif et d'éthanol marqué au ^{14}C.

La molécule d'éthanol est constituée de deux fonctions chimiques différentes. Le premier carbone « C_1 » représente la fonction alcool, le second « C_2 » est porteur de la fonction méthyl. Comme il est possible que les deux parties de la molécule ne soient pas oxydées de la même manière, il nous a paru intéressant de réaliser nos expériences avec de l'éthanol marqué au ^{14}C, alternativement sur le premier et sur le deuxième carbone.

Nous ferons d'abord une étude comparative du comportement respiratoire de la levure en présence de ces deux alcools radioactifs seuls. Ensuite, nous verrons l'influence du glucose sur l'oxydation du premier et du deuxième carbone de l'éthanol.

A. Conditions expérimentales

Nous utilisons la technique du « circuit ouvert » décrite dans la première partie de notre exposé (Matériel et Techniques utilisées, cf. p. 16). Celle-ci permet de recueillir dans la soude, le gaz carbonique formé par la respiration au fur et à mesure de son dégagement. Ce CO_2 est dosé pondéralement sous forme de CO_3Ba insoluble et la radioactivité est évaluée sur ce même précipité. A la fin de chaque expérience, nous

TABLEAU XII : *Distribution et bilan de la radioactivité retrouvée en fonction de la vitesse d'administration de l'*ETHANOL *marqué sur le carbone en position 1 ou 2, en absence de glucose.*

Poids de levure sèche utilisée : 74 mg. Durée des expériences : 6 heures.

ETHANOL administré seul		Radioactivité retrouvée exprimée en mM d'ETHANOL et en pour cent de la radioactivité totale administrée									
		Sous forme de CO_2		Dans la levure		Dans le milieu extracellulaire				Bilan	
						Produits intermédiaires		Ethanol restant			
Vitesse d'administration	Quantité totale										
mM/h/g	mM	mM	%	mM	%	mM	%	mM	%	mM	%
$CH_3\ ^{14}CH_2\ OH$											
0,50	0,222	0,165	74,0	0,055	25,0	0,002	1,0	0,005	2,0	0,227	102,0
1,00	0,444	0,304	68,5	0,122	27,5	0,008	2,0	0,008	2,0	0,442	100,0
1,65	0,735	0,402	54,5	0,204	28,0	0,150	20,0	0,007	1,0	0,763	103,5
2,00	0,890	0,404	45,5	0,229	25,5	0,211	24,0	0,030	3,5	0,874	98,5
2,50	1,110	0,414	38,0	0,235	21,0	0,395	35,5	0,050	4,5	1,094	99,0
3,30	1,470	0,428	29,0	0,236	16,0	0,670	45,5	0,100	7,0	1,434	97,5
$^{14}CH_3\ CH_2\ OH$											
0,50	0,222	0,058	26,0	0,152	69,0	0,005	2,0	0,005	2,0	0,220	99,0
1,00	0,444	0,096	22,0	0,328	74,0	0,003	0,5	0,008	2,0	0,435	98,5
1,65	0,735	0,101	13,5	0,470	64,0	0,146	20,0	0,007	1,0	0,724	98,5
2,00	0,890	0,101	12,0	0,517	58,0	0,233	26,0	0,030	3,0	0,881	99,0
2,50	1,110	0,100	9,0	0,536	48,5	0,407	37,0	0,050	4,5	1,093	99,0
3,30	1,470	0,100	7,0	0,565	38,5	0,650	44,0	0,100	7,0	1,415	96,5

séparons, par centrifugation de la suspension, les cellules de levure. Après oxydation de la levure et du surnageant en CO_2 et précipitation sous forme de CO_3Ba, nous mesurons leurs radioactivités respectives. Nous déterminons, par la méthode de dosage de Nicloux, la quantité d'éthanol libre restant dans le milieu en fin d'expérience et nous la défalquons de la quantité totale administrée pour obtenir la quantité utilisée.

Ainsi pour chaque expérience, nous pouvons connaître :

1° Le volume total du CO_2 éliminé par la respiration et la radioactivité de ce CO_2.

2° La radioactivité incorporée dans la levure.

3° La radioactivité des produits de dégradation incomplète rejetés dans la suspension (radioactivité totale du surnageant moins celle de l'alcool non métabolisé).

Nous utilisons des quantités de levure et de substrats identiques à celles des expériences précédentes. L'administration des substrats s'effectue également en perfusion continue. La radioactivité des solutions d'éthanol marqué en « C_1 » est de 466 impulsions /min /mg; celle des solutions d'alcool marqué en « C_2 » est de 620 impulsions /min /mg. Pour comparer les résultats correspondant à ces deux alcools, nous avons ramené, par le calcul, les chiffres obtenus à une radioactivité spécifique initiale commune, soit à celle de « C_1 ». (Les résultats obtenus avec « C_2 » sont donc multipliés par le rapport $\frac{466}{620}$).

B. Résultats :

1° *Expériences effectuées avec l'éthanol ^{14}C seul, marqué alternativement sur la fonction alcool « C_1 » et sur la fonction méthyl « C_2 ».*

Nous avons porté les résultats obtenus sur le tableau XII ainsi que sur les figures 10 et 10 *bis*. Chaque chiffre représente la moyenne de trois expériences. La radioactivité spécifique de l'alcool administré étant toujours rapportée à la même valeur, nous avons exprimé en mM d'éthanol correspondant la radioactivité retrouvée que nous subdivisons en :

— éliminée dans le CO_2,
— incorporée dans la levure,
— retrouvée dans le milieu,
  — sous forme d'éthanol libre,
  — sous forme de produits intermédiaires.

Il ressort de la comparaison de ces résultats que les deux carbones de l'éthanol ne sont pas métabolisés de façon semblable :

1° Le carbone porteur de la fonction alcool « C_1 » est éliminé sous forme de CO_2 de façon beaucoup plus importante que celui de la fonction méthylée « C_2 ».

2° Inversement il s'accumule davantage de « C_2 » que de « C_1 » dans les cellules de levure.

3° Cependant si nous effectuons la somme des radioactivités éliminées dans le CO_2 et retrouvées dans la levure, nous constatons que celle-ci a la même valeur pour les deux carbones.

4° Dans le surnageant, « C_1 » et « C_2 » sont retrouvés en quantités équivalentes.

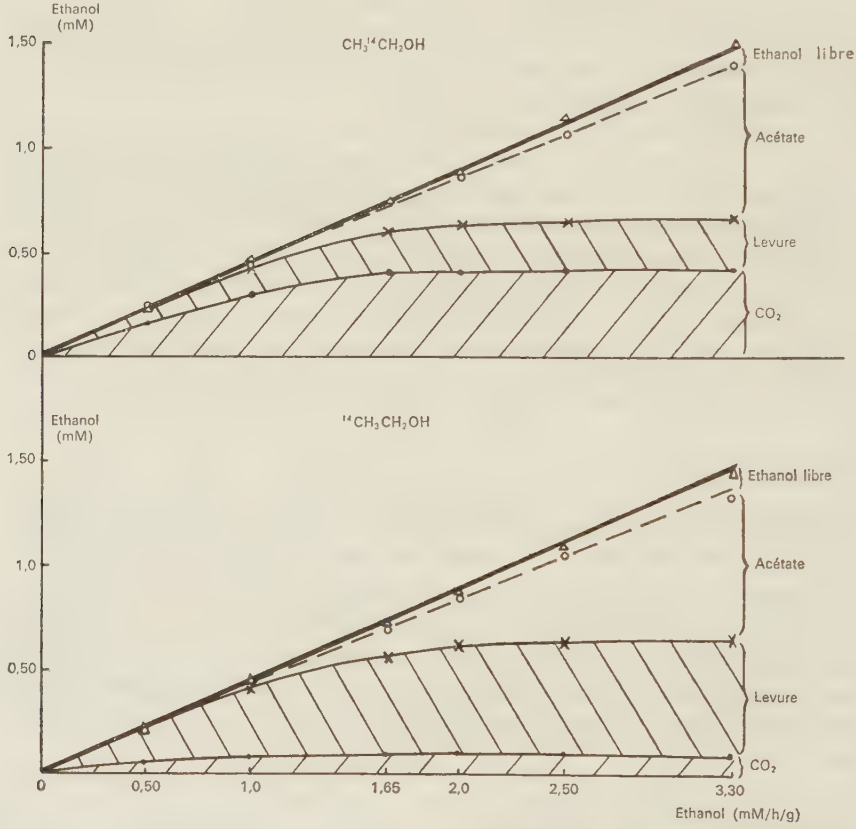


Figure 10 et 10 bis : *Distribution de la radioactivité retrouvée en fonction de la vitesse d'administration de l'éthanol marqué sur le carbone en position 1 ou 2*

Radioactivité exprimée en mM d'éthanol :

Éthanol administré : —

Éthanol retrouvé : dans CO_2 •—• ; dans la levure ×—× ; dans le milieu (acétate) ○—○ ; dans le milieu (alcool) Δ—Δ.

Ces faits peuvent être rapprochés des résultats trouvés en 1956 par Ter Karapetjan. Cet auteur, étudiant l'oxydation et l'assimilation aérobie de l'acide acétique marqué par des levures du genre Candida, constate : « que les deux atomes de carbone de l'acide acétique ne sont pas équivalents dans le processus du métabolisme aérobie. Le ^{14}C du groupement carboxylé est principalement éliminé sous forme de CO_2. Le ^{14}C du groupement méthylé est utilisé dans sa plus grande partie pour la synthèse cellulaire. »

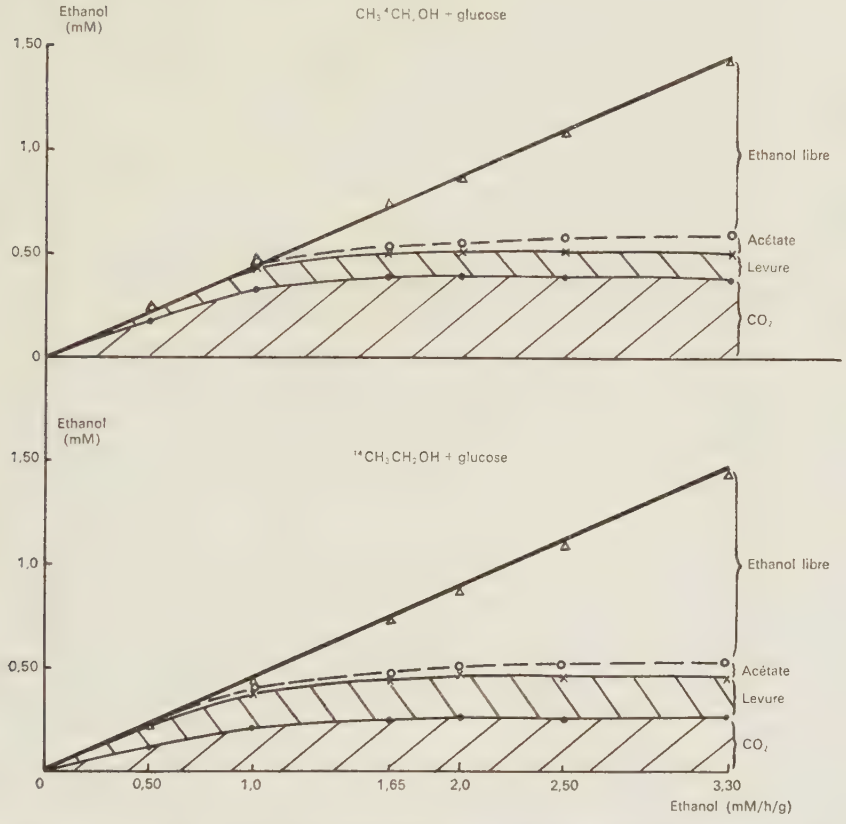


Figure 11 et 11 bis : *Distribution de la radioactivité retrouvée en fonction de la vitesse d'administration de l'éthanol marqué sur le carbone en position 1 ou 2 en présence de glucose (mélanges équimoléculaires)*

Les valeurs portées en abscisse représentent uniquement l'éthanol.
Radioactivité exprimée en mM d'éthanol :

Éthanol administré : —

Éthanol retrouvé { dans CO_2 •—• ; dans la levure ×—× ; dans le milieu (acétate) ○—○ ; dans le milieu (alcool) Δ—Δ

TABLEAU XIII : *Distribution et bilan de la radioactivité retrouvée en fonction de la vitesse d'administration de l'*ETHANOL *marqué en position 1 ou 2, en présence de* GLUCOSE.

Le mélange de glucose et d'éthanol est équimoléculaire. Poids de levure sèche utilisée : 74 mg. Durée des expériences : 6 heures.

ETHANOL administré (en présence de GLUCOSE)		Radioactivité retrouvée exprimée en m M d'ETHANOL et en pour cent de la radioactivité totale administrée									
Vitesse d'administration de l'ETHANOL	Qantité totale	Sous forme de CO_2		Dans la levure		Dans le milieu extracellulaire Produits intermédiaires		Ethanol restant		Bilan	
m M/h/g	m M	mM	%	mM	%	mM	%	mM	%	mM	%
$CH_3\ ^{14}CH_2\ OH$											
0,50	0,222	0,165	74,0	0,055	25,0	0,007	3,0	0,003	1,0	0,230	103,0
1,00	0,444	0,335	75,5	0,113	25,0	0,016	3,5	0,014	2.5	0,478	106,5
1,65	0,735	0,393	53,0	0,123	17,0	0,040	3,5	0,160	22,0	0,716	97,5
2,00	0,890	0,394	44,0	0,123	14,0	0,024	3,0	0,340	38,0	0,881	99,0
2,50	1,110	0,386	35,0	0,135	12,0	0,023	2,5	0,590	53,0	1,134	102,5
3,30	1,470	0,378	25,5	0,131	9,0	0.105	7,0	0,880	60,0	1,494	101,5
$^{14}CH_3\ CH_2\ OH$											
0,50	0,222	0,119	54,0	0,093	42,0	0,007	3,0	0,003	1,0	0,222	100,0
1,00	0,444	0,210	47,5	0,184	41,5	0,026	6,0	0,014	3,0	0,434	98,0
1,65	0,735	0,241	33,0	0,205	28,0	0,043	6,0	0,190	26,0	0,679	93,0
2,00	0,890	0,259	29,0	0,211	24,0	0,046	5,0	0,340	38,0	0,856	96,0
2,50	1,110	0,240	21,5	0,201	18,0	0,030	3,0	0,590	53,5	1,061	96,0
3,30	1,470	0,267	18,0	0,184	12,5	0,120	8,0	0,880	60,0	1,451	98,5

2° *Expériences effectuées avec l'éthanol marqué en « C_1 » ou en « C_2 », en présence de glucose.*

a) *Rapports équimoléculaires entre les deux substrats.* Les expériences sont conduites de la même manière que précédemment, les solutions infusées sont composées d'un mélange équimoléculaire de glucose et d'éthanol « $^{14}C_1$ » ou « $^{14}C_2$ ».

Le tableau XIII et les figures 11 et 11 *bis* expriment les résultats obtenus.

En comparant les tableaux XII et XIII et les figures 10 et 11, nous observons :

1. Que l'élimination du $^{14}CO_2$ provenant du « C_1 » a la même intensité qu'il y ait ou non présence de glucose. Mais il n'en est pas de même pour le « C_2 », lorsque le glucose est présent la radioactivité du $^{14}CO_2$ a plus que doublé. Elle reste toutefois plus faible que celle du « C_1 ».

2. Que, dans la levure, la radioactivité des produits accumulés a diminué légèrement avec l'éthanol marqué sur « C_1 » et très fortement avec l'alcool marqué en « C_2 ». Par conséquent, le très grand écart qui existait entre la radioactivité retrouvée dans la levure pour les deux carbones de l'éthanol, quand celui-ci était administré seul, a considérablement diminué.

3. Que nous retrouvons peu de radioactivité dans les produits intermédiaires pour le mélange éthanol-glucose. Il y a ici confirmation des résultats observés avec l'éthanol non marqué en présence de glucose. L'alcool, dans ce cas, fournit peu de produits d'oxydation incomplète (acétate).

La présence du glucose exerce un large effet de stimulation sur l'oxydation en CO_2 du carbone méthylé de l'alcool, mais n'a aucune action sur le carbone porteur de la fonction alcool. De plus, le glucose réduit la quantité de matériel de réserves qui se forme à partir de l'éthanol, cet effet s'exerçant principalement sur le carbone porteur de la fonction méthyl qui donnait la plus grande quantité de réserves avec l'éthanol seul.

b) *Rapports variables entre éthanol « $^{14}C_2$ » et glucose.* Nous venons de voir que la présence de glucose modifie surtout le métabolisme du « C_2 » de l'éthanol. Nous avons cherché ici à savoir dans quelles mesures cette modification est dépendante de la quantité de glucose présente dans le milieu.

Ces expériences sont faites en ajoutant à une quantité fixe d'éthanol marqué sur « C_2 », des quantités variables de glucose. La vitesse d'administration choisie pour l'éthanol est 0,50 mM /h /g, et nous avons ajouté successivement à cet alcool, le glucose aux vitesses de 0,125, 0,25, 0,50, 1,0 mM /h /g. Ainsi les pourcentages de glucose présents dans les mélanges

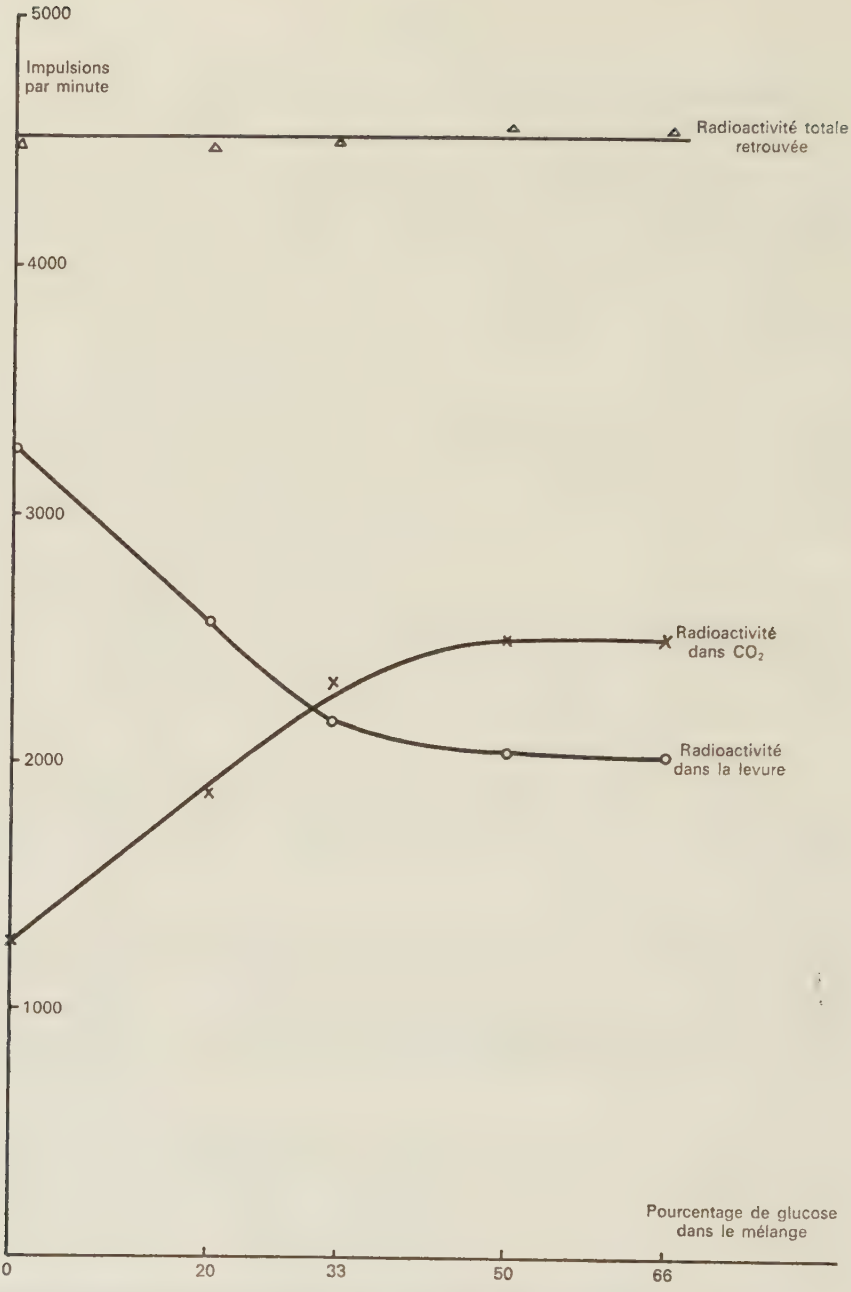


Figure 12 : *Effet de la teneur en glucose, dans le mélange éthanol-glucose, sur le métabolisme de l'alcool :* $^{14}CO_3\ CH_2\ OH$

(La vitesse d'administration de l'éthanol est fixe : 0,50 mM/h/g, c'est celle du glucose qui varie de 0 à 1 mM/h/g)

Radioactivité retrouvée { dans CO_2 ×—× ; dans levure ○—○ ; au total Δ—Δ

sont les suivants : 20 %, 33 %, 50 %, 66 %. Les résultats sont portés sur la figure 12 :

Nous voyons que l'oxydation en CO_2 de l'alcool subit une stimulation sous l'influence du glucose d'une façon d'abord proportionnelle à la quantité de sucre ajoutée. Puis lorsque la solution infusée contient environ 50 p. cent de chacun des substrats, l'effet de stimulation atteint son optimum, il n'est pas plus grand quand on augmente la proportion de glucose présente dans le mélange. Nous sommes donc dans les conditions de stimulation maximale en effectuant le mélange des substrats dans un rapport équimoléculaire.

Si l'on considère d'autre part, la radioactivité retrouvée dans la levure, nous voyons que la quantité de réserves marquées, diminue quand le glucose est présent. Cette diminution s'effectue progressivement comme la quantité de glucose ajoutée croît. C'est aussi pour 50 p. cent environ de chaque substrat que la quantité de réserves radioactives accumulées est à son minimum. La radioactivité retrouvée dans la levure ne sera pas plus faible si l'on augmente la proportion de glucose.

Nous sommes donc, quand le rapport entre le glucose et l'éthanol est équimoléculaire, dans les conditions où l'effet du glucose sur le métabolisme du groupement méthylé de l'éthanol atteint son maximum. Cette considération s'applique tant à l'augmentation du CO_2 formé, qu'à la diminution des réserves radioactives incorporées dans la levure.

C. Discussion et conclusions.

1° L'emploi d'éthanol marqué dans le mélange alcool-glucose confirme l'hypothèse déduite de l'observation du Q.R., à savoir : qu'une partie de l'énergie fournie à la levure par l'utilisation simultanée des deux substrats provient de l'oxydation de l'alcool.

2° Lorsque nous sommes au niveau des échanges respiratoires maximum (QO_2 sensiblement de même valeur avec glucose seul, éthanol seul ou mélange glucose-éthanol), nous avons observé sous l'effet de la présence du glucose une diminution importante de la quantité d'éthanol métabolisée. En dépit de cela, l'éthanol demeure dans une large mesure, une source d'énergie pour la levure.

Le mécanisme de son oxydation est modifié profondément. Il y a en quelque sorte une régularisation de l'oxydation de l'éthanol.

a) La première phase de l'oxydation de l'éthanol : transformation en acide acétique, se produit, quand l'alcool est seul, à vitesse plus grande que l'utilisation ultérieure de cet acide formé, et conduit à son accumulation dans le milieu. En présence de glucose, on observe une importante diminution de l'accumulation d'acide acétique.

b) Lorsque l'éthanol est métabolisé seul, une grande partie de la molécule entre dans des réactions de synthèses, conduisant à la formation de matières de réserves. C'est principalement le carbone porteur de la fonction méthyl qui est retenu par la levure. En présence de glucose, l'oxydation de la partie méthylée de la molécule d'éthanol est poussée plus loin, et moins de matériel de réserves est formé à partir de l'alcool.

3° *Calcul de la quantité d'oxygène attribuable à l'éthanol dans l'oxydation du mélange éthanol-glucose. Calcul du rapport* $\frac{O_2 \text{ alcool}}{O_2 \text{ total}}$

Il nous reste maintenant à savoir quelle proportion de l'oxygène consommé est attribuable à l'oxydation de l'éthanol, quand la levure est alimentée par le mélange alcool-glucose.

Nous avons vu que l'effet de stimulation maximum du glucose sur le métabolisme de l'alcool s'exerce quand le mélange des substrats est équimoléculaire. Nous avons donc effectué nos calculs avec les résultats obtenus en alimentant la levure avec les mélanges équimoléculaires d'alcool et de glucose.

Nous avons déterminé par la méthode du confinement le volume d'oxygène consommé, ainsi que le volume de gaz carbonique dégagé pendant l'oxydation des divers mélanges alcool-glucose.

A l'aide de la méthode du circuit ouvert, nous connaissons le volume de CO_2 attribuable à l'éthanol dans le cas du mélange car ici seul l'éthanol est marqué au ^{14}C. Toutefois, précisons qu'il est nécessaire d'additionner les volumes de CO_2 radioactifs obtenus avec « C_1 » et avec « C_2 », pour avoir la totalité du gaz carbonique provenant de l'alcool.

Nous ne connaissons pas le quotient respiratoire de l'éthanol dans le mélange, celui-ci étant variable en fonction de la dose d'alcool méta-

TABLEAU XIV : *Détermination de la quantité de CO_2 attribuable au* GLUCOSE *quand la levure respire en présence d'un mélange d'éthanol radioactif et de glucose non marqué : vol. CO_2 total — vol. $^{14}CO_2$ éthanol = vol. CO_2 glucose,*

Vitesse d'administration mM/h/g	CO_2 total mM (1)	$^{14}CO_2$ éthanol $CO_2\ ^{14}C_1 + CO_2\ ^{14}C_2$ mM (2)	CO_2 glucose mM (1) — (2) = (3)
GLUCOSE + ETHANOL			
0,50 + 0,50	0,697	(0,165 + 0,119) = 0,284	0,413
1,00 + 1,00	1,267	(0,335 + 0,210) = 0,545	0,722
1,65 + 1,65	1,607	(0,393 + 0,241) = 0,634	0,793
3,30 + 3,30	1,816	(0,378 + 0,267) = 0,645	1,171

bolisée et des conditions d'oxydation. Il est donc impossible de déterminer directement la quantité d'oxygène provenant du métabolisme de l'alcool. En conséquence nous devons effectuer les opérations suivantes :

1. CO_2 total — CO_2 alcool marqué = CO_2 glucose.

TABLEAU XIV bis : *Détermination de la quantité de O_2 attribuable à l'*ETHANOL *dans l'oxydation des mélanges de substrats : vol. O_2 total — vol. O_2 glucose = vol. O_2* ETHANOL.

Calcul de la fraction de l'oxygène consommé attribuable à l'éthanol dans la respiration en présence des mélanges éthanol-glucose.

Vitesse d'administration mM/h/g	O_2 total mM (4)	O_2 glucose mM (5)	O_2 éthanol mM (4)—(5)=(6)	$\frac{O_2 \text{ éthanol}}{O_2 \text{ total}}$ (6)/(4)
GLUCOSE + ETHANOL				
0,50 + 0,50	0,812	0,413/1,015 = 0,407	0,405	0,50
1,00 + 1,00	1,532	0,722/1,018 = 0,710	0,822	0,54
1,65 + 1,65	1,962	0,973/1,025 = 0,950	1,012	0,51
3,30 + 3,30	2,097	1,171/1,040 = 1,127	0,970	0,46

2. Nous savons que le quotient respiratoire du glucose est fixe et toujours égal à $\simeq$ 1,0; nous faisons l'hypothèse qu'en présence d'alcool, ce Q.R. n'est pas modifié, ainsi :

vol O_2 glucose = vol CO_2 glucose : Q.R. trouvé avec le glucose seul.

3. Connaissant le volume total de l'oxygène consommé pour l'utilisation du mélange des substrats, l'oxygène revenant à l'alcool se calcule ainsi :

$$O_2 \text{ alcool} = O_2 \text{ total} - O_2 \text{ glucose.}$$

4. Il ne nous reste plus qu'à effectuer le rapport $\frac{O_2 \text{ alcool}}{O_2 \text{ total}}$, afin de déterminer, pour chaque vitesse d'administration des substrats, la quantité relative d'oxygène provenant de l'éthanol dans la somme des oxydations.

Notons que, dans ce calcul, nous n'avons pas soustrait la respiration endogène de la respiration totale. Les réserves endogènes sont de type glucidique et elles sont métabolisées pendant l'utilisation des substrats exogènes (voir chapitre II). Il convient donc ici, d'assimiler les

réserves endogènes au glucose exogène et de ne pas soustraire, des échanges gazeux totaux trouvés, ceux attribuables à la respiration endogène.

En conclusion : Quand une levure, en aérobiose, reçoit simultanément un mélange équimoléculaire d'éthanol et de glucose (rapport pour lequel la stimulation de l'oxydation de l'alcool sous l'influence du glucose est à son maximum), la consommation d'oxygène provenant de l'éthanol couvre environ 50 p. cent des dépenses énergétiques totales.

TROISIÈME PARTIE

RECHERCHES CONCERNANT L'INFLUENCE DE LA PRÉSENCE D'AZOTE DANS LE MILIEU SUR LE MÉTABOLISME DU GLUCOSE ET DE L'ÉTHANOL CHEZ LA LEVURE

I. Introduction.

Le travail qui précède a été effectué dans un milieu dépourvu d'azote exogène. Ce chapitre sera consacré à l'étude comparée de l'influence de l'azote minéral et de l'azote organique sur les échanges gazeux de la levure respirant soit en présence de glucose, soit en présence d'éthanol.

L'azote minéral et l'azote aminé sont assimilés par la levure : Smythe (1939), ainsi que Winzler et ses collaborateurs (1944), ont observé qu'en anaérobiose l'assimilation de l'azote ammoniacal s'accompagne d'une augmentation importante de la fermentation.

Massart et Heymans (1950) ont constaté que l'adjonction au milieu glucosé de sulfate d'ammonium, en aérobiose, stimule les réactions productrices d'énergie.

« Lorsque la quantité de sucre est assez faible pour qu'il n'y ait pas de fermentation, cette stimulation se traduit par une augmentation de la consommation d'oxygène. Si la quantité de glucose est élevée, la fermentation aérobie se trouve alors très fortement intensifiée. »

En 1953, Massart et Horens ont mis d'autre part en évidence que l'assimilation de l'azote des acides aminés, provoque également une augmentation de la consommation d'oxygène en présence de glucose. D'après les travaux d'Holzer et Witt (1960), il faut considérer que l'action du sulfate d'ammonium s'exerce sur le cycle de dégradation du glucose qui passe par la voie du pentose-phosphate. La présence du sel d'ammonium dans le milieu provoquerait un accroissement de l'oxydation du glucose par ce mécanisme.

Il nous a semblé intéressant de voir si l'azote minéral et l'azote organique ont également une action sur la respiration de la levure alimentée en éthanol.

Afin de pouvoir effectuer une comparaison valable entre les résultats obtenus d'une part avec le glucose, et d'autre part avec l'éthanol, nous avons réalisé nos expériences, parallèlement, dans des conditions identiques avec l'un et l'autre de ces substrats.

II. Conditions expérimentales.

Ces expériences sont effectuées à l'aide de la méthode manométrique de WARBURG, à la température de 30°. Nous employons 2,5 mg de levure sèche en suspension dans 2 ml de tampon phosphaté à pH 5.

Le choix de la quantité de glucose à utiliser est dicté par le souci d'éviter la fermentation aérobie. Avec 0,005 mMoles de glucose, nous avons une concentration initiale de 0,45 p. mille, pour laquelle la fermentation ne se produit pas. Nous avons également utilisé 0,005 mMoles d'éthanol. Les sources azotées sont le sulfate d'ammonium, le glycocolle et l'α-alanine.

La suspension de levure est préparée directement avec le substrat azoté. Le glucose ou l'alcool sont contenus dans le bras latéral de la fiole. Le mélange est effectué lorsque l'équilibre de température est atteint : c'est le temps O de la mesure des échanges gazeux. La respiration est suivie jusqu'à la chute complète de la consommation d'oxygène.

Précisons que nous n'avons jamais constaté dans ces conditions expérimentales, de prolifération cellulaire ou de bourgeonnement en fin d'expérience.

III. Résultats.

A. Action de l'azote minéral : sulfate d'ammonium

1° *Sur la respiration endogène.*

Il n'y a pas de modification des échanges gazeux.

2° *Sur la respiration en présence de glucose.*

La consommation du glucose témoin s'effectue en 210 minutes, avec absorption de 240 µl d'oxygène. (Il aurait fallu 670 µl d'O_2 pour brûler complètement ce glucose, ce qui donne un rapport d'oxydation de 0,36.)

Nous avons déterminé la concentration de sulfate d'ammonium nécessaire et suffisante pour obtenir une augmentation maximale des échanges gazeux. Cette augmentation est proportionnelle à la concentration initiale du sel d'ammonium entre 0,01 et 0,05 p. mille. Elle atteint son maximum d'intensité pour 0,05 p. mille, il suffit donc de 0,021 mg d'azote ammoniacal. La consommation totale d'oxygène devient alors

égale à 325 µl. L'augmentation est de 35 p. cent, le rapport d'oxydation s'élève à $\frac{320}{610}$ soit 0,48. Ces résultats sont portés sur le tableau XV.

Nous voyons, sur la figure 13, que ce n'est pas la pente initiale de la consommation de l'oxygène qui augmente. La présence d'azote a seulement pour effet de retarder le fléchissement de cette pente. Il faut cependant un temps équivalent au témoin pour obtenir la chute complète des échanges gazeux.

3° *Sur la respiration en présence d'éthanol.*

En absence de sulfate d'ammonium, il faut 210 minutes pour que les échanges respiratoires s'infléchissent complètement. La consommation totale d'oxygène est alors de 240 µl. Comme il faudrait 336 µl d'oxygène pour brûler complètement les 0,005 mM d'éthanol administrés, le rapport d'oxydation est ici égal à 0,72.

TABLEAU XV : *Influence de la nature de la source azotée sur la consommation totale d'oxygène en présence de glucose ou d'éthanol.*

Ces résultats sont obtenus avec 2,5 mg de levure sèche, à la température de 30°, à l'aide de la méthode de Warburg.

La consommation d'oxygène est suivie jusqu'à la chute complète des échanges respiratoires.

Le $SO_4 (NH_4)_2$ est administré à raison de 0,021 mg d'azote ammoniacal et l'α-alanine à raison de 0,32 mg d'azote aminé.

Nature du substrat	Nature de la source azotée	Oxygène consommé	Augmentation de la consommation d'oxygène		Rapport d'oxydation
		en µl	en µl	en %	
GLUCOSE					
0,005 mM	0	240	—	—	0,35
»	$SO_4 (NH_4)_2$	325	85	35	0,48
»	α-ALANINE	321	81	34	0,47
»	$SO_4 (NH_4)_2$ + α-ALANINE	403	163	68	0,60
ETHANOL					
0,005 mM	0	241	—	—	0,72
»	$SO_4 (NH_4)_2$	241	0	0	0,72
»	α-ALANINE	300	59	25	0,90
»	$SO_4 (NH_4)_2$ + α-ALANINE	300	59	25	0,90

En présence de sulfate d'ammonium, nous observons qu'il n'y a aucune augmentation de la consommation totale d'oxygène, contrairement à ce qui se passe avec le glucose, et ceci quelle que soit la concentration initiale de $SO_4(NH_4)_2$ employée. Mais cependant le sel d'ammonium n'est pas sans effet sur le métabolisme de l'éthanol ainsi que nous le voyons sur la figure 13. Nous constatons qu'en présence d'azote

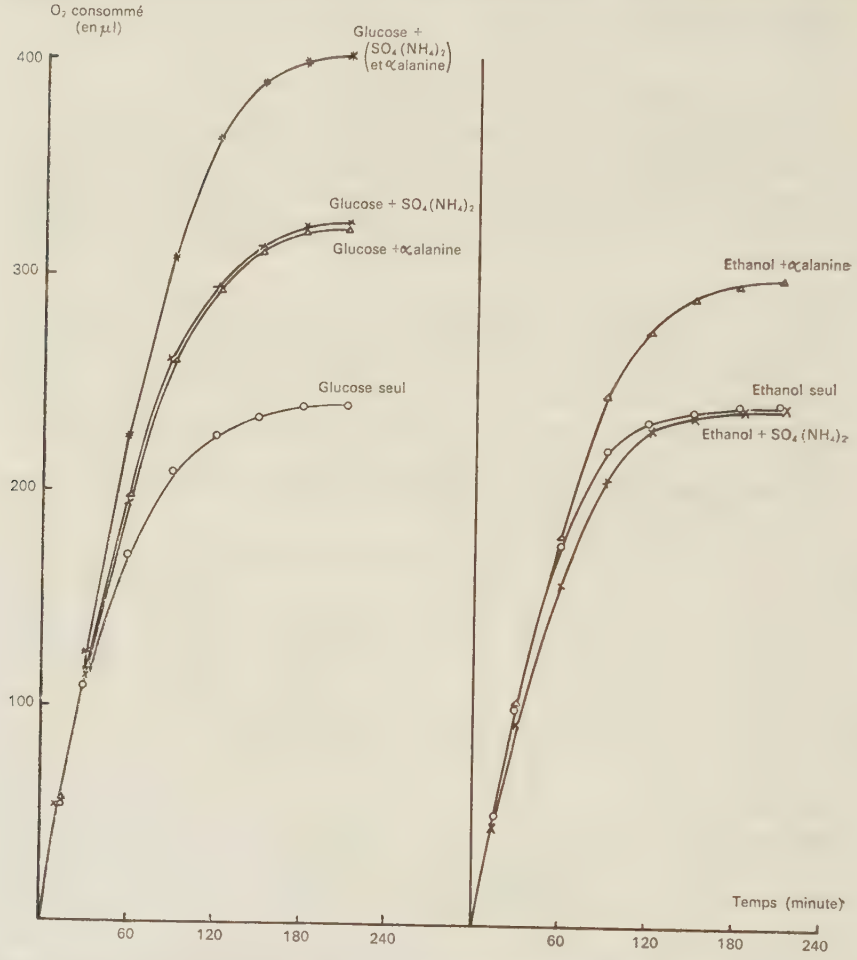


Figure 13 : *Consommation d'oxygène en fonction du temps pour une même quantité de substrat (glucose ou éthanol : 0,005 m M), oxydé seul ou en présence de substances azotées :*

Substrat seul témoin : ○—○

Substrat additionné de
- $SO_4(NH_4)_2$: ×—×
- α-alanine : Δ—Δ
- $SO_4(NH_4)_2$ et α-alanine : *—*

ammoniacal la pente de la courbe traduisant la consommation horaire d'oxygène est plus faible qu'avec le témoin éthanol seul. Toutefois cette pente s'infléchit un peu plus tardivement, de sorte qu'au bout de 210 minutes, la consommation totale d'oxygène reste la même dans les deux cas. Il nous a paru intéressant de suivre l'évolution du quotient respiratoire.

Lorsque l'alcool est seul, le Q.R. de départ est égal à 0,30 et graduellement celui-ci s'élève à 1,0. Avec adjonction d'azote ammoniacal, le quotient respiratoire initial est de 0,10, ensuite il s'élève jusqu'à 1,0 comme pour le témoin. Il semble donc qu'il y ait au début de l'oxydation de l'alcool une accélération de la transformation $CH_3CH_2OH \rightarrow CH_3COOH$, qui s'effectue avec un Q.R. égal à zéro.

Notons qu'il faut également un optimum de 0,021 mg d'azote ammoniacal pour que le phénomène ait un maximum d'intensité avec l'éthanol.

B. Action de l'azote organique : glycocolle et α-alanine

1° *Sur la respiration endogène.*

Il n'y a aucune modification des échanges gazeux.

2° *Sur la respiration en présence de glucose.*

Le glycocolle et l'α-alanine provoquent une augmentation de la consommation d'oxygène. L'α-alanine a une action environ deux fois plus marquée que le glycocolle. Nous avons donc principalement étudié l'effet de l'adjonction de l'α-alanine. Les résultats sont portés sur la figure 13. Nous voyons que les échanges gazeux se superposent, dans ce cas, à ceux trouvés avec le sulfate d'ammonium.

Il y a, pour ces deux formes d'azote un accroissement des échanges respiratoires d'environ 35 p. cent. Cependant, nous notons que la quantité seuil d'azote aminé nécessaire pour obtenir la stimulation maximale de la respiration est de 0,32 mg (soit 15 fois plus d'azote aminé que d'azote ammoniacal pour un même résultat). A ce propos, nous avons cherché à savoir si ces deux substances azotées agissaient de façon identique. En ajoutant simultanément le sulfate d'ammonium et l'α-alanine, à des concentrations suffisantes, nous avons obtenu une sommation des effets observés pour chacun d'eux. La consommation d'oxygène se trouve augmentée de 68 p. cent par rapport au témoin sans azote. Le rapport d'oxydation du glucose passe de 0,35 à 0,60. En doublant soit la quantité de $SO_4(NH_4)_2$, soit celle de l'α-alanine employés seuls, nous n'avons pas une augmentation de la consommation d'oxygène plus grande que 34 p. cent. Il apparaît donc que le mécanisme d'action de ces deux sources azotées est de nature différente.

3° *Sur la respiration en présence d'éthanol.*

Le glycocolle et l'α-alanine augmentent la consommation d'oxygène. Avec le glycocolle, l'augmentation est deux fois plus faible qu'avec l'α-alanine, ceci bien entendu avec suffisamment de chaque acide aminé dans les deux cas. Nous nous sommes donc plus particulièrement attachés à l'étude de l'α-alanine. Nous trouvons, avec cet acide aminé, une élévation des échanges gazeux de 25 p. cent. Le rapport d'oxydation qui était de 0,72 passe à 0,90. La pente initiale de la courbe de consommation d'oxygène n'est pas modifiée, son fléchissement est retardé, ce qui entraîne une consommation totale plus élevée dans le même temps, ainsi que nous le voyons sur la figure 13. Nous avons examiné en présence d'α-alanine, l'évolution du quotient respiratoire, il est en tous points comparable à celui du témoin contenant l'alcool seul.

IV. Conclusions.

L'assimilation de l'azote ammoniacal ou aminé exerce une influence très marquée sur les échanges gazeux de la levure, que celle-ci soit alimentée par du glucose ou par de l'éthanol.

1° *Azote minéral.*

La présence d'azote minéral augmente les échanges respiratoires avec le glucose. Cette action n'est pas observée avec l'éthanol. Cependant il faut noter que pour l'éthanol, au début de l'expérience, le quotient respiratoire et la vitesse de consommation de l'oxygène sont plus faibles qu'avec le témoin carencé en azote.

2° *Azote aminé.*

L'α-alanine exerce un effet de stimulation sur la consommation d'oxygène relative à l'utilisation tant du glucose que de l'alcool.

Cette augmentation des échanges gazeux est, dans le cas du glucose, quantitativement comparable à l'effet exercé par l'azote ammoniacal. Cependant, l'action de ces deux substances azotées s'additionnant, les deux phénomènes sont de nature différente.

Holzer (1960) a trouvé que la stimulation de la respiration en présence de glucose, sous l'action du sulfate d'ammonium, a lieu sur le cycle de dégradation du glucose qui passe par la voie du pentose-phosphate.

L'absence de stimulation exercée par le sel d'ammonium sur la respiration en présence d'éthanol pourrait s'expliquer par l'absence de ce cycle, inconcevable pour l'alcool.

Par contre la similitude d'action de l'α-alanine sur les échanges respiratoires au cours de l'oxydation de l'éthanol et du glucose semble indiquer qu'il y a une relation entre l'oxydation de ces deux substrats, sans doute au niveau du cycle tricarboxylique.

DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

Dans le cadre d'une étude sur l'aspect physiologique de l'oxydation de l'éthanol au niveau de la respiration cellulaire, nous avons examiné les modalités de l'utilisation de cet alcool chez la levure de boulangerie (Saccharomyces cerevisiae) en absence et en présence de glucose.

En tant qu'organisme monocellulaire, la levure permet d'atteindre le niveau de la respiration cellulaire proprement dite, à condition d'éviter la prolifération et la fermentation.

La prolifération ne se produit pas lorsque nous utilisons un milieu dépourvu d'azote et de facteurs de croissance. Nous avons mis au point les conditions expérimentales permettant d'éviter la fermentation du glucose.

Afin d'analyser les relations existant entre l'utilisation énergétique du glucose et de l'éthanol en aérobiose, nous avons effectué une étude comparative de la respiration de la levure métabolisant soit du glucose, soit de l'éthanol, soit un mélange éthanol-glucose.

Dans la première partie de notre travail, nous décrivons les techniques et l'appareillage que nous avons utilisés pour la réalisation de nos expériences.

Dans la seconde partie, nous effectuons une étude du comportement respiratoire de la levure dans une milieu dépourvu d'azote.

1. Notre travail s'effectue en aérobiose, mais nous savons que la présence d'oxygène inhibe partiellement la fermentation (Effet Pasteur), mais ne la supprime pas complètement. Nous avons observé que l'apparition de la fermentation aérobie est liée à la concentration du glucose dans le milieu. Tant que celle-ci ne dépasse pas sensiblement 1 p. mille, la fermentation ne se manifeste pas. Nous avons mis au point les conditions permettant d'obtenir la consommation de quantités importantes de glucose, sans qu'il y ait une trop forte concentration de sucre dans le milieu. Pour cela, le substrat est administré en perfusion régulière et continue dans la suspension de levure. Cette technique permet, en outre, d'obtenir des échanges respiratoires de niveau constant pendant toute la durée de l'expérience. Ce niveau est directement fonction de la vitesse d'administration du substrat. Avec l'éthanol, nous avons adopté le même mode d'administration.

2. Nous avons étudié la respiration endogène de la levure : celle-ci résulte de l'utilisation de métabolites endocellulaires oxydés en donnant un quotient respiratoire égal à l'unité, c'est-à-dire de type glucidique. Cette oxydation de métabolites endogènes persiste lors de l'utilisation de substrats exogènes.

3. En présence de glucose, nous constatons que le niveau maximum des échanges gazeux ($QO_2 = 94$ environ) est atteint lorsque la vitesse d'administration de ce sucre est de 3,3 mM/h/g de levure sèche. Mais, quelle que soit la quantité de glucose utilisée par la levure, le quotient respiratoire est toujours égal à l'unité et le rapport d'oxydation se situe aux environs de 0,35.

4. En présence d'éthanol, nous observons que les volumes d'oxygène consommés par la levure sont les mêmes qu'en présence de glucose, lorsque les vitesses d'administration de ces substrats sont identiques. Notons que le QO_2 maximum est toujours égal à 94.

Après infusion continue d'éthanol dans le milieu de suspension, pendant 6 heures, le bilan du métabolisme de l'alcool utilisé par la levure se traduit qualitativement de la façon suivante :

— une partie est oxydée totalement en gaz carbonique,

— une partie est retenue dans les cellules sous forme de réserves,

— une partie n'est oxydée que jusqu'au stade acide acétique que l'on retrouve dans le milieu de suspension.

L'existence et l'intensité de chacune de ces réactions est fonction de la quantité d'éthanol que l'on fournit à la levure. Elles apparaissent successivement quand la vitesse d'administration de l'alcool augmente :

— une très petite quantité d'éthanol est complètement oxydée en CO_2 et H_2O (vitesse d'administration jusqu'à 0,03 mM/h/g de levure sèche),

— entre 0,03 et 1,5 mM/h/g, il y a oxydation partielle en CO_2 et apparition de réserves intracellulaires,

— entre 1,5 et 3,3 mM/h/g, on observe en plus une accumulation d'acétate dans le milieu. Quand ce troisième phénomène commence à se produire, les deux précédents ont atteint leur intensité maximum,

— enfin quand la vitesse d'administration de l'éthanol dépasse 3,3 mM/h/g de levure sèche, l'accumulation d'acide acétique se stabilise également et l'alcool excédentaire reste non oxydé dans le milieu.

Le quotient respiratoire moyen, ainsi que le rapport d'oxydation sont donc variables et dépendent de la vitesse d'administration. De 0,67 (correspondant à la combustion totale de l'éthanol), le quotient respiratoire s'abaisse jusqu'à 0,30, tandis que parallèlement le rapport d'oxydation passe de 1,0 à 0,45.

L'utilisation d'alcool marqué au ^{14}C, alternativement sur l'un et l'autre des carbones, permet de constater que les deux carbones de la molécule sont métabolisés différemment par la levure. Le carbone porteur de la fonction alcool « C_1 » est oxydé sous forme de CO_2 de façon beaucoup plus importante que celui du groupement méthylé « C_2 »; il s'accumule davantage de « C_2 » que de « C_1 » dans la levure.

5. En présence d'un mélange éthanol-glucose, nous observons que la consommation d'oxygène est la même qu'avec le glucose seul ou l'alcool seul, pourvu que la vitesse d'administration totale de ce mélange exprimée en mM/h/g de levure sèche, soit identique à celle de chacun des substrats introduit séparément dans le milieu de suspension.

Le QO_2 résultant de l'oxydation du mélange éthanol-glucose, ne dépasse jamais 95-100. C'est à dire, qu'il y a addition complète des consommations d'oxygène provenant respectivement de l'oxydation de l'éthanol et du glucose, seulement lorsque leurs vitesses d'administration sont assez faibles pour que le QO_2 total n'excède pas cette valeur. Le quotient respiratoire obtenu, est intermédiaire entre celui de l'éthanol et du glucose. Quand le mélange des substrats est administré à des vitesses élevées, le quotient respiratoire révèle encore une oxydation simultanée d'alcool et de glucose, mais le QO_2 ne traduit pas une addition des volumes d'oxygène consommés pour chacun des substrats.

L'emploi d'éthanol marqué au ^{14}C, utilisé en même temps que du glucose non marqué, confirme cette oxydation simultanée et démontre que la présence du glucose modifie le processus d'oxydation de l'éthanol. On observe :

— une augmentation de la quantité de gaz carbonique radioactif éliminé, c'est le groupement méthylé de l'éthanol qui est alors plus largement oxydé;

— une diminution de la quantité de réserves radioactives accumulées dans la levure;

— une diminution de la quantité d'acide acétique accumulée dans le milieu.

C'est lorsque le rapport entre éthanol et glucose est équimoléculaire que ces phénomènes présentent un maximum d'intensité. C'est donc, pour ce rapport équimoléculaire, que nous avons calculé le volume d'oxygène attribuable à l'alcool lors de la respiration en présence des deux substrats. Ce volume d'oxygène représente 50 pour cent de la consommation totale de ce gaz pour toutes les vitesses d'administration des substrats. Lorsque le glucose et l'éthanol sont utilisés simultanément en concentrations équimoléculaires, la moitié de l'énergie utilisée par la levure provient de l'oxydation de l'alcool. Cette utilisation

simultanée a lieu même lorsque la levure reçoit à la fois suffisamment de l'un et de l'autre des substrats pour couvrir ses besoins énergétiques maximum; il n'y a donc pas d'aliment préférentiel.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par L. DONTCHEFF chez les animaux soumis à un régime glucidique.

Enfin, dans la troisième partie de notre travail nous avons examiné l'effet de la présence d'azote dans le milieu, sur l'oxydation de l'éthanol et du glucose. Nous avons comparé l'action de deux sources azotées :

— minérale : sulfate d'ammonium

— organique : α-alanine.

La respiration endogène, n'est modifiée par aucune forme d'azote exogène.

Dans le cas du glucose seul, la consommation totale d'oxygène est augmentée tant par l'azote minéral que par l'azote organique. Précisons que ces deux formes azotées, n'agissent pas de la même manière, puisqu'il y a sommation des effets observés lors de leur addition simultanée.

Avec l'éthanol seul, le sulfate d'ammonium est sans action, tandis que l'α-alanine augmente les échanges respiratoires.

L'action de l'α-alanine sur la respiration en présence de glucose et d'éthanol doit être de même nature et s'exerce au niveau des réactions du cycle tricarboxylique.

En conclusion, nous avons pu établir un parallélisme entre la respiration de la levure de boulangerie, et la respiration élémentaire des cellules des organismes supérieurs. Nous avons mis en évidence, chez la levure, l'oxydation simultanée du glucose et de l'éthanol. De plus, nous avons établi les conditions dans lesquelles la moitié des oxydations nécessaires à la respiration cellulaire peut être assurée par l'alcool, comme c'est le cas au niveau du métabolisme basal chez les animaux supérieurs.

BIBLIOGRAPHIE

AISENBERG, A. C. et POTTER, V. R. (1957). — *J. Biol. Chem.*, *224*, 1115.

AISENBERG, A. C., REINAFARJE, B et POTTER, V. R. (1957). — *J. Biol. Chem.*, *224*, 1099.

AUBERT, J. P. (1951). — *Année Biol.*, *55*, 197.

AUBERT, J. P. et MILHAUD, G. (1955). — *C. R. Acad. Sci.*, *240*, n° 19, 1943.

AUBERT, J. P. et MILHAUD, G (1955). — *C. R. Acad. Sci.*, *240*, n° 25, 2451.

AUBERT, J. P. et MILHAUD, G. (1956). — *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, *90*, n° 3, 320.

BLUMENTHAL, H. J., LEWIS, K. F. et WEINHOUSE, S. (1954). — *J. Am. Chem. Soc.*, *76*, 6093.

BRÜCKE, F. T. (1933). — *Biochem. Z.*, *264*, 157.

CARPENTER, T. M. (1933). — *Hand. Biol. Arbeitsmeth., Abderhalden, Abt. IV, Teil 13*, 593.

CHESTER, V. E. (1959). — *Nature*, *183*, 902.

CHESTER, V. E. (1959). — *Nature*, *184*, 1956.

CLARK, W. N. (1928). — *111 Ed. Williams and Wilkins Co, Baltimore.*

CLIFTON, C. E. (1946). — *Advances in Enzymol.*, *6*, 269.

CLIFTON, C. E. (1952). — In «The Enzymes», (SUMMER, J. B. and MYRBACK K. eds). Vol. II, Part. 2, *Academic Press*, New York, 912.

DAWES, E. A. et RIBBONS, D. W. (1962). — *Ann. Rev. Microbiol.*, U.S.A., *16*, 241.

DONTCHEFF, L. (1937). — *C. R. Soc. Biol.*, *126*, 462 et 465.

DONTCHEFF, L. (1939). — *C. R. Soc. Biol.*, *130*, 1404, 1406, 1410.

DONTCHEFF, L. (1953). — *Thèse Sciences*, Strasbourg.

DONTCHEFF, L. (1953). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, *35*, n° 7, 685.

DONTCHEFF, L. (1956). — *Récents Progrès de Physiologie*, Paris (P.U.F.).

DUMAZERT, C. H. (1936). — *Thèse Pharmacie*, Marseille.

EATON, N. R. (1959). — *Biochim. et Biophys. Acta*, *36*, 259.

EATON, N. R. (1960). — *Arch. Biochem. Biophys.*, *88*, 17.

ENGELHARDT, V. A. et SAKOV, N. E. (1943). — *Biokhimiya*, *8*, 9.

EULER (Von), H., ADLER, E. et HELLSTRÖM, H. (1936). — *Z. Physiol. Chem.*, *241*, 239.

FALES, F. W. (1951). — *J. Biol. Chem.*, *193*, 113.

FINK, H. (1931). — *H.-S. Z. f. Physiol. Chem.*, *195*, 215.

GRONLUND, A. F. et CAMPBELL, J. J. R. (1961). — *J. Bactériol.*, *81*, 721.

HALVORSON, H. (1958). — *Biochim. et Biophys. Acta*, *27*, 255.

HANES, C. S. (1929). — *Biochem. J.*, *23*, 99.

HAYES, J. E. et VELICK, S. F. (1954). — *J. Biol. Chem.*, *207*, 225.

Hoch, F. L. et Vallée, B. L. (1959). — *In «Sulphur in Proteins»*, Academic Press, New York, 245.
Hoch, F. L. et Vallée, B. L. (1960). — *Arch. Biochem. Biophys., 91*, 1.
Holzer, H. et Witt, I. (1960). — *Biochim. et Biophys. Acta, 38*, 163.
Iscaki, S. et Pottier, M. (1959). — *C. R. Soc. Biol., 153*, 764.
Iscaki, M. (1963). — *C. R. Soc. Biol., 157*, 736.
Katz, J. et Wood, H. G. (1960). — *J. Biol. Chem.*, U.S.A., *235*, n° 8, 2165.
Keleti, T. (1958). — *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 13*, 239.
Klein, H. P. (1955). — *J. Bactériol., 69*, 620.
Kleinzetler, A. (1948). — *Advances in Enzymol., 8*, 299.
Kornberg, H. L. (1959). — *Ann. Rev. Microbiol. U.S.A., 13*, 49.
Le Breton, E. et Schaeffer, G. (1934). — *C.R. Soc. Biol., 115*, 854.
Le Breton, E. (1936). — *Ann. Physiologie, 12*, n° 3, 369.
Libby, W. F. (1947). — *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 19*, 2.
Lundin, H. (1923). — *Biochem. Z., 141*, 310.
Lundin, H. (1923). — *Biochem. Z., 142*, 454.
Mahler, H. R. et Douglas, J. (1957). — *J. Am. Chem. Soc., 79*, 1159.
Martius, C et Lynen, F. (1950). — *Adv. Enzym., 10*, 167.
Massart, L. et Heymans, P. (1950). — *Bull. Soc. Chim. Biol., 32*, 879.
Massart, L. et Horens, J. (1953). — *Enzymologia, 15*, 359.
Mayerhof, O. (1925). — *Biochem. Z., 162*, 43.
Milhaud, G. et Aubert, J. P. (1955). — *C. R. Acad. Sci., 240*, n° 22, 2178.
Milhaud, G. et Aubert, J. P. (1955). — *C. R. Acad. Sci., 241*, n° 5, 525.
Müller, D. (1933). — *Biochem. Z., 262*, 239.
Müller, D. (1934). — *Biochem. Z., 268*, 152.
Negelein, E. et Wulff, H. (1937). — *Biochem. Z., 293*, 351.
Nicloux, M. (1931). — *Bull. Soc. Chim. Biol., 13*, 857.
Nord, F. F. et Weiss, S. (1958). — *In «The Chemistry and Biology of Yeasts»* Cook Ed., Academic Press, New York, 358.
Novelli, G. D. et Lipmann, F. (1950). — *J. Biol. Chem., 182*, 213.
Nygaard, A. P. et Theorell, H. (1955). — *Acta Chem. Scand., 9*, 1300.
Nygaard, A. P. et Theorell, H. (1955). — *Acta Chem. Scand., 9*, 1551.
Osburn, O. L. et Werkman, C. H. (1932). — *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 4*, 421.
Pickett, M. J. et Clifton, C. E. (1943). — *J. Cellular Comp. Physiol., 21*, 77.
Panek, A. (1959). — *C. R. Acad. Sci., 249*, n° 2, 333.
Pottier, M. (1961). — *C. R. Soc. Biol., 155*, n° 2, 254.
Prevot, A. R. (1954). — *Techniques de laboratoire*, Masson et C^le^ ed., 471.
Pullman, M. E., Colowick, S. P. et Kaplan, N. O. (1952). — *J. Biol. Chem., 194*, 593.
Racker, E. (1950). — *J. Biol. Chem., 184*, 313.
Racker, E. (1955). — *Methods in Enzymology*, Vol. 1, 500.
Reiner, J. M., Gest, H. et Kamen, M. D. (1949). — *Arch. Biochem., 20*, 175.
Schiner, V. J., Malher, H. R. Backer, R. H. et Hiatt, R. R. (1960). — *Ann. N. Y. Acad. Sci., 84*, 583.

Smedley-Maclean, I. et Hoffert, D. (1923). — *Biochem. J. London, 10*, 135.
Smedley-Maclean, I. et Hoffert, D. (1926). — *Biochem. J. London, 20*, 343.
Smythe, C. V. (1939). — *Enzymologia, 6*, 9.
Spiegelman, S. et Nozawa, M. (1945). — *Arch. Biochem. 6*, 303.
Stickland, L. H. (1956). — *Biochem. J., 64*, 498.
Stier, T. J. B. et Stannard, J. N. (1936). — *J. Gen Physiol., 19*, 461.
Stier, T. J. B. et Stannard, J. N. (1936). — *J. Gen. Physiol., 19*, 479.
Stier, T. J. B. et Stannard, J. N. (1937). — *J. Cellular Comp. Physiol., 10*, 78.
Sund, H. et Theorell, H. (1963). — *In «The Enzymes»* Academic Press, New York, Vol. 7, 25.
Ter Karapetjan, (1956). — *Akad. Nauk, armjan S.S.R. Dolk, 23*, n° 3, 125.
Trevelyan, W. E. et Harrison, J. S. (1956). — *Biochem. J., 63*, 23.
Trevelyan, W. E. (1958). — *In «The Chemistry and Biology of Yeasts»*, Cook Ed. Academic Press, New York, 369.
Umbreit, W. W., Burris, R. H. et Stauffer, J. F. (1951). — *«Manometric Techniques and Tissue Metabolism»*, 17.
Vallée, B. L. (1960). — *In «The Enzymes»* 2nd éd., Vol. III, 225.
Van Eys, J., Ciotti, M. M. et Kaplan, N. O. (1957). — *Biochim. et Biophys. Acta, 23*, 581.
Van Eys, J., Ciotti, M. M. et Kaplan, N. O. (1958). — *J. Biol. Chem., 231*, 571.
Van Eys, J. et Kaplan, N. O. (1957). — *J. Am. Chem. Soc., 79*, 2782.
Van Slyke, D. D. et Folch, J. (1940). — *J. Biol. Chem., 136*, 509.
Wallenfels, K. et Sund, H. (1957). — *Biochem. Z., 329*, 17.
Wallenfels, K., Sund, H., Faessler, A. et Burchard, W. (1957). — *Biochem. Z., 329*, 31.
Weinhouse, S. et Millington, R. H. (1947). — *J. Am. Chem. Soc., 69*, 3089.
Westheimer, F. H. (1959). — *In «The Enzymes»* 2nd, éd., Vol. I, 259.
Winzler, R. J. et Baumberger, J. P. (1938). — *J. Cellular Comp. Physiol. 12*, 183.
Winzler, R. J. (1940). — *J. Cellular Comp. Physiol., 15*, 143.
Winzler, R. J., Burk, D. et du Vigneaud, V. (1944). — *Arch. Biochem., 5*, 25.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 7
— Présentation du sujet 7
— Bref aperçu du comportement métabolique de la levure 8
— Présentation du travail. Plan de l'exposé 12

PREMIÈRE PARTIE : MATÉRIEL ET TECHNIQUES 13

I. Matériel : La levure de boulangerie « Saccharomyces cerevisiae » de marque SPRINGER 13

II. Techniques et Appareillage 14

A. Mesure des échanges respiratoires 14
1° Méthode du confinement et analyse des gaz 14
2° Techniques manométriques 15
3° Méthode du circuit ouvert 16
Dosage pondéral du CO_2 sous forme de carbonate de baryum 17

B. Techniques d'administration des substrats 17
1° Administration de la totalité du substrat à la suspension de levure, par simple mélange au départ de l'expérience 17
2° Administration continue et régulière du substrat dans le milieu de suspension pendant toute la durée de l'expérience 17

C. Détermination des quantités de glucose et d'éthanol utilisées par la levure 18
1° Dosage du glucose par la méthode de HANES (1929) ... 18
2° Dosage de l'éthanol par la méthode de NICLOUX (1931). 18
3° Dosage de l'éthanol marqué au ^{14}C 19
a) Oxydation persulfurique de l'alcool 19
b) Précipitation du carbonate de sodium formé en carbonate de baryum 19
c) Mesure de la radioactivité 20
Établissement de la courbe de self-absorption 20

D. Identification et dosage de l'acide acétique formé 21

E. Étude quantitative des réserves formées 22
1° Évaluation des poids secs 22

2° Détermination des produits radioactifs retenus dans la levure lors de l'utilisation d'éthanol marqué..... 22

F. Évaluation de la matière vivante : Examen des cellules au microscope 23

1° Bourgeonnement 23

2° Numération des cellules..... 23

G. Abréviations 23

H. Précision des résultats 24

DEUXIÈME PARTIE : Recherches concernant le comportement de la levure en milieu dépourvu d'azote..... 25

Chapitre I : Étude du comportement respiratoire de la souche de levure utilisée..... 25

I. Respiration en présence soit de glucose soit d'éthanol Détermination de l'influence du mode d'administration des substrats 25

A. Respiration de la levure en présence de glucose..... 25

1° Administré en totalité au début de l'expérience..... 25

a) Intensité de l'activité respiratoire..... 26

b) Intensité de l'activité fermentaire..... 26

c) Courbe du Q.R..... 26

2° Mode d'administration du substrat : perfusion continue et régulière..... 27

B. Respiration de la levure en présence d'éthanol..... 28

1° Administré en totalité au début de l'expérience. Variations des QO_2, QCO_2 et Q.R..... 28

2° Administré en perfusion continue et régulière à différentes vitesses..... 29

a) Échanges respiratoires..... 30

b) Quotient respiratoire..... 30

C. Conclusion..... 31

II. Respiration endogène 31

A. Définition 31

B. Historique 31

C. Étude de la respiration endogène de la souche de levure utilisée 32

1° Conditions expérimentales 32

2° Résultats 33

III. Conclusions sur le comportement respiratoire de la levure utilisée. 34

Chapitre II : Étude de l'influence de l'éthanol et du glucose sur la respiration endogène 35

I. Considérations générales 35

II. Conditions expérimentales 35

III. Respiration endogène en présence d'éthanol 36
1° Résultats 36
2° Conclusion 38

IV. Respiration endogène en présence de glucose 38
1° Résultats 38
2° Conclusion 40

V. Conclusions 40

Chapitre III : Respiration en présence d'un mélange de glucose et d'éthanol exogènes 41

I. Administration de glucose et d'éthanol non radioactifs 41

A. Conditions expérimentales 41

B. Résultats 42

1° Examen des échanges respiratoires et des quantités de substrats utilisées 42

a) Avec le glucose seul 42
— QO_2, QCO_2 et Q.R. 42
— Quantités de glucose utilisées 42
— Adaptation de la levure aux fortes quantités de glucose 45
— Rapports d'oxydation 45

b) Avec l'éthanol seul 45
— QO_2, QCO_2 et Q.R. 45
— Quantités d'alcool consommées et rapports d'oxydation 47
— Étude détaillée du Q.R. en fonction de la vitesse d'administration 47
— Identification et dosage de l'acide acétique formé 47

c) Avec le mélange éthanol-glucose 50
1. Dans un rapport équimoléculaire 50
— Échanges gazeux et Q.R. 50
— Quantités de substrats consommées 53
2. Dans un rapport variable 53
— Q.R. 53

2° Examen des réserves formées 53
a) Aspect qualitatif 53
b) Aspect quantitatif 56

C. Discussion des résultats 56
1° QO_2 56
a) Glucose seul et éthanol seul 56
b) Mélange glucose-éthanol 58
2° Q.R 58
3° Quantités d'éthanol utilisées 59
4° Réserves formées 59
D. Conclusions 60
1° Éthanol et glucose seuls 60
2° Mélange éthanol-glucose 60

II. Administration d'un mélange de glucose non radioactif et d'éthanol marqué au ^{14}C 61

A. Conditions expérimentales 61
B. Résultats 63
1° Expériences effectuées avec l'éthanol ^{14}C seul, marqué alternativement sur la fonction alcool « C_1 » et sur la fonction méthyl «C_2 » 63
2° Expériences effectuées avec l'éthanol marqué en « C_1 » ou en « C_2 », en présence de glucose 67
a) Rapports équimoléculaires entre les 2 substrats. 67
b) Rapports variables entre éthanol $^{14}C_2$ et glucose. 67
C. Discussion et conclusions 69
1° Oxydation simultanée des substrats 69
2° Modification du métabolisme de l'éthanol sous l'effet du glucose 69
3° Calcul de la quantité d'oxygène attribuable à l'éthanol dans l'oxydation du mélange éthanol-glucose. Calcul du rapport $\frac{O_2 \text{ alcool}}{O_2 \text{ total}}$ 70

TROISIÈME PARTIE : Recherches concernant l'influence de la présence d'azote dans le milieu sur le métabolisme du glucose et de l'éthanol chez la levure 73

I. Introduction 73
II. Conditions expérimentales 74
III. Résultats 74
A. Action de l'azote minéral : Sulfate d'ammonium 74
1° Sur la respiration endogène 74
2° Sur la respiration en présence de glucose 74
3° Sur la respiration en présence d'éthanol 75

B. Action de l'azote organique : Glycocolle et α-alanine..... 77
1° Sur la respiration endogène..... 77
2° Sur la respiration en présence de glucose..... 78
3° Sur la respiration en présence d'éthanol..... 78
IV. Conclusions 78
1° Azote minéral 78
2° Azote aminé 78

Discussion des résultats et conclusions..... 79

Bibliographie 83

Table des matières 87

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

« La fixation du gaz carbonique par les tissus »

Vu et approuvé :

Paris, le 24 Février 1965

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE

Imprimé en France
TYPOGRAPHIE FIRMIN-DIDOT ET Cie. — MESNIL (EURE). — 179
Dépôt légal : 2e trimestre 1965.